



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**SILIMARINA MODIFICA A ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -
ATPASE E DA MAO E MODULA A AÇÃO DE
ANTIMICROBIANOS *IN VITRO***

TESE DE DOUTORADO

Dayanne Rakelly de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**SILIMARINA MODIFICA A ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -ATPASE
E DA MAO E MODULA A AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS *IN*
*VITRO***

Dayanne Rakelly de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Dr^a Roselei Fachinetto
Co-orientador: Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Dayanne Rakelly de
Atividade antioxidante e modulatória de resistência
microbiana de silimarina in vitro / Dayanne Rakelly de
Oliveira.-2015.
71 f.; 30cm

Orientadora: Roselei Fachinetto
Coorientador: Irwin Rose Alencar de Menezes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2015

1. Silimarina 2. Estresse oxidativo 3. MAO 4. Na⁺/K⁺-
ATPase. Peroxidação lipídica 5. Atividade antimicrobiana.
Resistência bacteriana I. Fachinetto, Roselei II.
Menezes, Irwin Rose Alencar de III. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Dayanne Rakelly de Oliveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: dayanne_rakelly@yahoo.com.br

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica

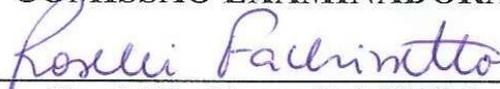
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

SILIMARINA MODIFICA A ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -ATPASE E
DA MAO E MODULA A AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS *IN*
VITRO

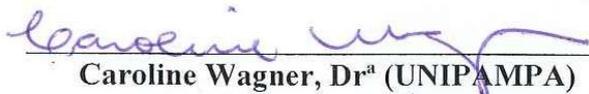
elaborada por
Dayanne Rakelly de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

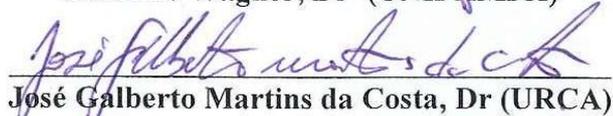
COMISSÃO EXAMINADORA:



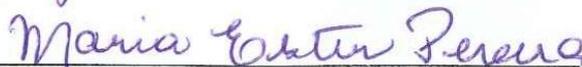
Roselei Fachinetto, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



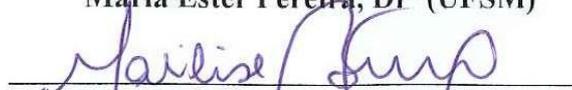
Caroline Wagner, Dr^a (UNIPAMPA)



José Galberto Martins da Costa, Dr (URCA)



Maria Ester Pereira, Dr^a (UFSM)



Marilise Escobar Burger, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 10 de junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Reconheço que este trabalho é resultado de um esforço coletivo e que por mais que eu queira contemplar a totalidade dos envolvidos, certamente, não conseguirei atingir este objetivo. Mas vamos tentar...

A Deus, que representa a força impulsionadora da existência humana e que nos dá coragem e sabedoria para enfrentar com humildade os desafios da vida.

A minha mãe, Edite Oliveira pelo seu imenso amor, por suas orações, por sua grandiosa e inabalável fé, pelos seus valiosos ensinamentos que me levaram à conquista deste título.

Ao meu amor eternizado – meu PAI, Fernando José de Oliveira (*in memoriam*). A vida não me permitiu compartilhar com o senhor a conquista deste título e eu sei o quanto nós esperamos por este dia, mas acredite o senhor hoje, mais do que nunca, faz-se presente em minha vida. O teu bem me acompanha, me conduz, me fortalece, me humaniza e me faz querer ser melhor a cada dia. Amor incondicional!

Ao grande amor da minha vida: meu sobrinho, Eduardo Oliveira Nobre. O meu amor por você me deu forças para enfrentar com dignidade cada obstáculo e chegar até aqui e certamente continuará me conduzindo.

Então eu cheguei em ti: minha amada irmã, Nayaana Karina Oliveira Nobre, e fica difícil agradecer por tudo que você representa em minha vida. Tu sabes que tudo que tenho e sou compartilho contigo e que o nosso amor fraternal perpassa para além do humanamente explicável...

A minha sobrinha/princesa, Maria Clara. Meu anjo, você ainda é tão pequenina e já se faz tão presente em meu coração.

A minha amada tia, Raimunda Sousa Freitas (tia Mundinha) pelo incentivo nos momentos difíceis... Seu amor e suas orações foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao meu cunhado, Michel Nobre de Melo, muito obrigada pelo seu apoio constante.

À professora Dr^a Roselei Fachinetto, minha orientadora, grande exemplo de dedicação... Muito obrigada pela construção deste trabalho.

Ao professor Dr. Irwin Rose, co-orientador deste trabalho. Muito obrigada pelo seu apoio e pela parceria desde o mestrado.

Ao professor Dr. Henrique Douglas, o qual viabilizou a elaboração do segundo artigo desta tese, disponibilizando seu laboratório e apoiando este trabalho.

Aos meus colegas de doutorado e aos colegas do Laboratório, nominalmente: Larissa, Luis, Alcindo, Caroline Pilecco, Catiúscia, Elizete, Bárbara, Caroline Leal e Getúlio, os quais contribuíram de forma singular para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

À Universidade Regional do Cariri e aos meus colegas de trabalho do Departamento de Enfermagem.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SILIMARINA MODIFICA A ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -ATPASE E DA MAO E MODULA A AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS *IN VITRO*

AUTORA: DAYANNE RAKELLY DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Dr^a. ROSELEI FACHINETTO

CO-ORIENTADOR: Dr. IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de junho de 2015.

A Silimarina é um complexo de flavonolignanas isolado das sementes de *Silybum marianum*, sendo utilizada no tratamento de distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, incluindo hepatopatias e doenças neurológicas, como a Doença de Parkinson. Embora a silimarina seja referida por possuir uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatório, anticancerígeno e neuroprotetor, informações sobre o seu potencial antimicrobiano e modulador de fármacos contra a resistência microbiana são escassas na literatura. Além disso, o possível envolvimento da ação antioxidante no seu efeito neuroprotetor, e sobre a atividade de enzimas importantes do Sistema Nervoso Central (como a Na^+/K^+ -ATPase e a monoamina oxidase - MAO), ainda não foi completamente elucidado. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da silimarina na atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e MAO bem como a sua capacidade de modular a ação de antimicrobianos *in vitro*. Os resultados demonstraram que a silimarina sequestrou o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) e também reduziu significativamente a peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro de ratos induzida por nitroprussiato de sódio (5 μM) e Fe^{+2} (10 μM). A silimarina protegeu contra a oxidação dos grupos tióis proteicos (e não proteicos) induzida pelos pró-oxidantes e evitou a diminuição na atividade da catalase causada pelos pró-oxidantes, na concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A incubação de diferentes concentrações de silimarina aumentou a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e reduziu a atividade das enzimas MAO-A e MAO-B. No entanto, a inibição da MAO-B foi mais pronunciada. A avaliação dos parâmetros cinéticos demonstrou que a silimarina não alterou de forma significativa os valores de K_m para a MAO-A e MAO-B, mas causou diminuição nos valores de V_{max} para as duas isoformas da enzima. No que diz respeito à atividade antimicrobiana, a silimarina e o seu principal componente ativo, a silibinina, não demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica clinicamente relevante (com valores de CIM - concentração inibitória mínima superiores a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, a silibinina apresentou atividade antibacteriana clinicamente significativa contra *Escherichia coli* com CIM/8 de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A combinação de silibinina ou silimarina demonstrou efeito sinérgico modulando a eficácia de fármacos antibióticos (amicacina, gentamicina, ciprofloxacino ou imipenem) ou antifúngicos (mebendazol ou nistatina) particularmente da classe dos aminoglicosídeos, contra as cepas multirresistentes de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, a silibinina antagonizou o efeito antibacteriano da gentamicina e do imipenem contra *P. aeruginosa*. Da mesma forma, a silimarina e a silibinina tiveram efeito antagônico com a nistatina contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida kruzei*. Em conclusão, os resultados mostraram que a silimarina altera as atividades da Na^+/K^+ -ATPase e MAO, indicando que o seu efeito neuroprotetor não está apenas associado à sua capacidade antioxidante. O potencial da silimarina e da silibinina para modular o efeito de fármacos antimicrobianos sugere uma alternativa para o controle das infecções bacterianas provocadas pela resistência aos antibióticos.

Palavras-chave: Silimarina. Silibinina. Estresse oxidativo. Monoamina oxidase. Na^+/K^+ -ATPase. Peroxidação lipídica. Concentração inibitória mínima. Modulação antimicrobiana.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SILYMARIN MODIFIES THE ACTIVITY OF THE Na^+/K^+ -ATPASE AND MAO AND MODULATES THE ACTION OF ANTIMICROBIAL *IN VITRO*

AUTHOR: DAYANNE RAKELLY DE OLIVEIRA
ADVISOR: Dr^a. ROSELEI FACHINETTO
CO-ADVISOR: Dr. IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES
Date and Place of the Defense: Santa Maria, June 10th, 2015.

The Silymarin is a flavonolignan complex isolated from milk thistle seeds of *Silybum marianum* being used in the treatment of injury related to oxidative stress, including liver and neurological diseases, as Parkinson disease. Although silymarin has been reported to possess a variety of pharmacological properties including anti-inflammatory, anticarcinogenic and neuroprotective effects, information regard its antimicrobial and drug modulator potential against microbial resistance is scanty in the literature. In addition, the possible involvement of antioxidant activity in its neuroprotective effect, and on the activity of important enzymes of the central nervous system (i.e., Na^+/K^+ -ATPase and monoamine oxidase (MAO)) have not yet been completely elucidated. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of silymarin on the activity of the enzymes Na^+/K^+ -ATPase and MAO as well as its ability in to modulate the action of antimicrobials *in vitro*. The results demonstrated that silymarin scavenged the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical and, also reduced significantly the Fe^{2+} (10 μM) and SNP (sodium nitroprusside, 5 μM) induced lipid peroxidation in rat brain homogenate. Silymarin protected against the oxidation of thiol groups (protein and non-protein) induced by the pro-oxidants, and avoided the reduction in the activity of catalase caused by pro-oxidants at a concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The incubation of different concentrations of silymarin increased the activity of Na^+/K^+ -ATPase enzyme and reduced the activity of the enzymes MAO-A and MAO-B. However, the inhibition of MAO-B was more pronounced. The evaluation of the kinetic parameters demonstrated that Silymarin did not alter significantly the K_m values for MAO-A and MAO-B, but caused a decrease in V_{max} values for both isoforms of the enzyme. With regard to the antimicrobial activity, silymarin and its major active constituent silybin, did not demonstrate antibacterial and antifungal activities not relevant from a clinical point of view (with values of MIC - minimal inhibitory concentration- > 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). However, silybin showed clinically significant antibacterial activity against *Escherichia coli* with $\text{MIC}/8 = 64 \mu\text{g}/\text{mL}$. The combination of silymarin and silybin demonstrated synergistic activity modulating the efficacy of antibiotics drugs (amikacin, gentamicin, ciprofloxacin ou imipenem) or antifungal (mebendazole ou nystatin), particularly from the class of aminoglycosides, against multiresistant strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. However, silybin antagonized the antibacterial effect of gentamicin and imipenem against *P. aeruginosa*. Similarly, silymarin and silybin had antagonistic effect with nystatin against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida kruzei*. In conclusion, the results showed that silymarin alters the activities of Na^+/K^+ -ATPase and monoamine oxidase, indicating that its neuroprotective effect is not only associated to its antioxidant capacity. The potential of silymarin and silybin to modulate the effects of the drugs suggests an alternative to control bacterial infections caused by antibiotics resistance.

Keywords: Silymarin. Silibinin. Oxidative stress. Monoamine oxidase. Na^+/K^+ -ATPase. Lipid peroxidation. Minimal inhibitory concentration. Antimicrobial modulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da Silibinina	22
Figura 2 – Estrutura química da Silibina A e Silibina B	22
Artigo 1	
Table 1 – Composition of Silymarin	31
Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of Silymarin ..	31
Figure 2 – (A) Total antioxidant capacity of the Silymarin. (B) Effect of Silymarin on the inhibition of DPPH radical	31
Figure 3 – Effects of Silymarin on A) SNP (5 μ M)- or B) Fe ²⁺ (10 μ M)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates	32
Figure 4 – Effects of Silymarin on catalase levels of rat brain homogenates pre-incubated with A) Fe ²⁺ (10 μ M) or B) SNP (5 μ M).....	32
Figure 5 – Effects of Silymarin on protein (A and B) and non-protein (C and D) thiol content of rat brain homogenate incubated with SNP (5 μ M) or Fe ²⁺ (10 μ M) different pro-oxidant agents.. ..	33
Figure 6 – Effect of Silymarin on Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity in rat brain.....	34
Figure 7 – Inhibitory potential of silymarin on <i>in vitro</i> (A) MAO-A and (B) MAO-B activities in the mitochondrial fraction of rat brain. Substrate concentration curves for <i>in vitro</i> (C) MAO-A and (D) MAO-B activity in the absence or presence of silymarin (30, 100 or 300 μ g/ml) in the mitochondrial fraction of rat brain.	34
Artigo 2	
Table 1 – Origin of bacterial strains and their resistance to antibiotics.....	41
Table 2 – Composition of Silymarin extract.....	41
Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of Silymarin, detection UV was at 288 nm.....	42
Figure 2 – MIC of the antibiotics in the absence and presence of Silymarin and Silibinin at subinhibitory concentrations for <i>E. coli</i> strain EC06.....	42
Figure 3 – MIC of the antibiotics in the absence and presence of Silymarin and Silibinin at subinhibitory concentrations for <i>P. aeruginosa</i> strain PA03.....	42
Figure 4 – MIC of the antibiotics in the absence and presence of Silymarin and Silibinin at subinhibitory concentrations for <i>S. aureus</i> strain SA10	43
Figure 5 – MIC of the Nystatin in the absence and presence of Silymarin and Silibinin at subinhibitory concentrations for <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> and <i>C. kruzei</i>	43
Figure 6 – MIC of the mebendazole in the absence and presence of Silymarin and Silibinin at subinhibitory concentrations for <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> and <i>C. kruzei</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MT	– 3-metoxitiramina
ADP	– Adenosina difosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
<i>C. albicans</i>	– <i>Candida albicans</i>
<i>C. kruzei</i>	– <i>Candida kruzei</i>
<i>C. tropicalis</i>	– <i>Candida tropicalis</i>
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
DOPAC	– Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	– Doença de Parkinson
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilidrazina
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
EO	– Estresse Oxidativo
ERN	– Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	– Flavina-adenosina-dinucleotídeo
GSH	– Glutationa
H ₂ O ₂	– Peróxido de Hidrogênio
HVA	– Ácido Homovanílico
K_m	– constante de Michaelis-Menten
MAO	– Monoamina Oxidase
MAO-A	– Monoamina Oxidase, isoforma A
MAO-B	– Monoamina Oxidase, isoforma B
MDA	– Malondialdeído
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	– Sódio, Potássio - ATPase
NO	– Óxido Nítrico
NPS	– Nitroprussiato de Sódio
OH·	– Radical Hidroxila
ONOO ⁻	– Peroxinitrito
<i>P. aeruginosa</i>	– <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RL	– Radical Livre
RNA	– Ácido Ribonucleico
<i>S. aureus</i>	– <i>Staphylococcus aureus</i>
SNC	– Sistema Nervoso Central
TBARS	– Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
$V_{máx}$	– Velocidade máxima

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Geração de espécies reativas e o estresse oxidativo	12
1.1.1 Indutores químicos de dano oxidativo.....	13
1.1.2 Enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	14
1.2 O envolvimento da Monoamino oxidase na patogênese de doenças neurológicas.....	15
1.3 Potencial antimicrobiano de produtos naturais.....	17
1.4 Considerações gerais sobre Silimarina e Silibinina.....	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 RESULTADOS	27
3.1 Artigo 1 – Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase in vitro	28
3.2 Artigo 2 – In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products Silymarin and Silibinin	38
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES.....	54
6 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	56
REFERÊNCIAS	57

APRESENTAÇÃO

Esta tese aborda assuntos relativos à linha de pesquisa de estresse oxidativo e patologias humanas associadas. Encontra-se estruturada da seguinte forma:

No item **INTRODUÇÃO** consta uma Revisão da Literatura com explanação sobre os temas abordados na tese.

Os itens **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** estão apresentados na forma de dois artigos seguindo às normas dos respectivos periódicos.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** estão no final da tese e trazem interpretações e comentários sobre os resultados descritos nos artigos à luz dos autores e ainda, o item **PERSPECTIVAS DO ESTUDO** aponta a possibilidade de novos estudos a partir dos resultados obtidos.

As **REFERÊNCIAS** estão citadas nos artigos, e as referências utilizadas para a **INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO** estão elencadas no final da tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Geração de espécies reativas e o estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas durante os processos metabólicos fisiológicos. Essas, incluem espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicalares, tais como, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), estando envolvidas na fagocitose, na produção energética, no crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de importantes substâncias bioativas (DROGE, 2002; DIAZ *et al.*, 1998).

Os radicais livres (RL) apresentam uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado em seu eixo orbital externo, o que o torna extraordinariamente reativo à interação com elementos celulares. Um RL é extremamente instável, possui vida média muito curta e procura estabilidade por meio do pareamento de seus elétrons. Logo, os radicais livres podem causar danos à saúde humana por reagirem com substratos biológicos, proteínas, lipídeos de membrana, sendo que os danos mais graves são aqueles provocados ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e ao ácido ribonucleico (RNA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998; HALLIWELL, 2006).

Reconhecidamente um RL pode reagir com os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e provocar alterações estruturais significativas na permeabilidade da membrana, com extravasamento de fluídos e sua ruptura. Alguns tecidos e órgãos apresentam uma suscetibilidade maior à ação de EROs. O cérebro é um órgão particularmente vulnerável, pois possui baixos níveis de defesa antioxidante e ainda, altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, além de utilizar grandes quantidades de oxigênio, sendo, portanto, mais vulnerável aos efeitos provocados pelas EROs (SULTANA; BUTTERFIELD, 2004).

As EROs e outros radicais livres podem ser produzidas por fontes endógenas ou exógenas. As principais fontes endógenas de radicais livres são as mitocôndrias, através do metabolismo oxidativo; os peroxissomos, os quais são ricos em enzimas que geram H_2O_2 ; o citocromo P-450, o qual catalisa reações que geram o $O_2^{\cdot-}$; a fagocitose, a qual acelera o

consumo de oxigênio e subsequente formação de RL. Como fontes exógenas, podem ser citados a radiação, o cigarro, solventes orgânicos, fármacos, como o paracetamol, por exemplo (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

É importante mencionar que a produção excessiva de EROs e/ou de ERNs ou uma deficiência nas defesas antioxidantes ou ainda, a combinação de ambas situações, pode acarretar uma condição conhecida por estresse oxidativo - EO (SILVA *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006), sendo necessária a ação de um sistema de defesa antioxidante não enzimático e/ou enzimático para a manutenção do equilíbrio redox. Fazem parte do sistema de defesa antioxidante endógeno importantes enzimas, a exemplo da catalase - Cat, superóxido dismutase - Sod, glutathione peroxidase - GPx e glutathione reductase - GR, além de antioxidantes, como a glutathione - GSH, podendo também, a dieta humana ser fonte de antioxidantes exógenos como vitaminas A, E e C e flavonoides, por exemplo (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Dentre os antioxidantes endógenos podemos ressaltar a glutathione, a qual constitui um importante recurso para evitar danos oxidativos. Essa biomolécula é imprescindível a funções vitais como, manutenção do equilíbrio tiólico e neutralização de radicais livres (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; LU, 1999).

A partir da compreensão dos danos que o EO pode provocar ao organismo humano, vários modelos de indução de dano oxidativo *in vitro* e *in vivo* tem sido propostos e empregados para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos de plantas e seus constituintes fitoquímicos com vistas à descobertas de produtos antioxidantes de origem vegetal (HALLIWELL, 2006).

1.1.1 Indutores químicos de dano oxidativo

Alguns compostos químicos podem induzir o estresse oxidativo em organelas celulares, sendo inclusive utilizados em modelos experimentais *in vitro*. O ferro é um elemento essencial às funções orgânicas. Porém, o excesso deste íon pode ocasionar uma produção excessiva de radicais livres, disfunção mitocondrial, distúrbios na homeostase do cálcio que, por conseguinte, irão desencadear dano ao citoesqueleto e morte celular (OWENN *et al.*, 1997; CONNOR, 1997). O mecanismo pelo qual o ferro promove a lesão celular está relacionado à produção de radicais hidroxila, a partir da reação de Fenton. Nesta, um metal de

transição reduzido, como o ferro, doa um elétron para o H_2O_2 , o qual é posteriormente convertido ao radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Outro composto citotóxico é o nitroprussiato de sódio (NPS) dada à sua capacidade de liberar cianeto e/ou óxido nítrico. O óxido nítrico está envolvido em vários processos fisiológicos, como a neurotransmissão, a regulação do estado inflamatório (agregação plaquetária e vasodilatação), quimiotaxia e ainda, efeito bactericida (SAHA *et al.*, 2006; YUAN, *et al.*, 2009). Entretanto, em elevadas concentrações, o óxido nítrico pode conduzir à formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) como resultado de reação do ânion superóxido, potencializando o *status* oxidativo, levando à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA (BATES *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1991; DAWSON *et al.*, 1991; RAUHALA *et al.*, 1998). Adicionalmente, o óxido nítrico interfere no sistema de defesa antioxidante devido à sua capacidade de inibir a atividade de enzimas, como a catalase (COOPER, 1999; BROWN, 1995). Por sua vez, o cianeto causa inibição no complexo IV da cadeia respiratória, agindo na citocromo oxidase com subsequente bloqueio no transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Como resultado deste processo, tem-se uma utilização insuficiente do oxigênio (JENSEN, 2002).

Esses modelos de indução de dano oxidativo celular auxiliam, portanto, na avaliação do potencial antioxidante de substâncias apontadas como possuidoras de efeito protetor contra o estresse oxidativo. Este, por sua vez, pode ser responsável por uma diversidade de condições mórbidas, dentre elas, doenças neurológicas. Portanto, acredita-se na relevância de se investigar o possível efeito de produtos antioxidantes sobre enzimas importantes ao funcionamento do Sistema Nervoso Central.

1.1.2 Enzima Na^+/K^+ -ATPase

A Na^+/K^+ -ATPase é uma enzima de natureza sulfidrídica sensível a ação de agentes oxidantes, responsável pela clivagem de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP), com formação de adenosina difosfato (ADP), liberando energia para o transporte transmembrana de Na^+ e K^+ . Esta enzima é imprescindível ao equilíbrio eletrolítico celular, ao controle dos potenciais de membrana celular, bem como, à regulação da liberação e captação de neurotransmissores (ZHAN *et al.*, 2004). Encontra-se presente em grandes quantidades nos neurônios e células gliais (KWON *et al.*, 2003).

A manutenção do gradiente iônico negativo dentro da célula (altas concentrações de Na^+ extracelular e de K^+ intracelular) é vital às funções celulares, bem como, para a excitabilidade neuronal e equilíbrio do volume de células neuronais (ERECINSKA; SILVER, 1994). O déficit de energia, o aumento excessivo na produção de espécies reativas e consequente, estresse oxidativo celular acarretam alterações na atividade da Na^+/K^+ -ATPase (ZHANG *et al.*, 2008). Estudos apontam que prejuízos à enzima Na^+/K^+ -ATPase conduzem à entrada excessiva de cálcio para o interior da célula, e que esta sobrecarga, ocasiona eventos citotóxicos, disfunção mitocondrial, geração de radicais livres e apoptose (GREENE *et al.*, 1993; DEDEOGLU *et al.*, 2002).

A regulação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase é realizada por moduladores endógenos e pela fosforilação proteica, sendo que a função da mesma pode ser prejudicada por situações de estresse oxidativo (FOLMER *et al.*, 2004; MICHEL *et al.*, 2007). Evidências científicas apontam que uma diminuição na atividade desta enzima está relacionada com a patologia da depressão (EI-MALLAKH; WYATT, 1995; EI-MALLAKH; LI, 1993) e déficits cognitivos em vários modelos de doenças neurológicas, como a Doença de Parkinson (DP) e Doença de Alzheimer (JOVICIC *et al.*, 2008; BAGH *et al.*, 2008). Modelos experimentais demonstraram que o tratamento crônico com fármacos antidepressivos (p.e.: Fluoxetina) é capaz de ativar a enzima Na^+/K^+ -ATPase em cérebro de ratos (ZANATTA *et al.*, 2001).

1.2 O envolvimento da monoamino oxidase na patogênese de doenças neurológicas

A enzima monoamino oxidase (MAO), contendo o cofator flavina-adenosina-dinucleotídeo (FAD) acoplado à membrana mitocondrial externa, é encontrada nos terminais nervosos, fígado e outros órgãos, sendo responsável pela desaminação oxidativa e inativação de aminas biogênicas, convertendo-as em aldeídos correspondentes. Neurotransmissores, a exemplo da dopamina, norepinefrina e serotonina, são substratos da MAO (RANG *et al.*, 2012). Duas isoformas da MAO oxidam as monoaminas (MAO-A e MAO-B), cuja diferença primordial é a especificidade quanto ao substrato e à inibição. As duas isoformas demonstram estruturas terciárias bem semelhantes. Porém, apresentam particularidades em seus sítios catalíticos, característica responsável pela diferença na suscetibilidade à inibição. As diferenças mais pronunciadas ocorrem na área do sítio ativo relacionada ao reconhecimento do substrato (SOZIO *et al.*, 2012). Ambas isoformas são encontradas no tecido neuronal,

sendo que a MAO-A metaboliza preferencialmente serotonina e norepinefrina. Por sua vez, a MAO-B é encontrada especialmente nas plaquetas, e possui maior afinidade pela feniletilamina e benzilamina. No tecido cerebral, a dopamina é de forma predominante, oxidada pela MAO-B, localizada nas células gliais (BINDA *et al.*, 2011; ELHWUEGI, 2004).

Um dos fatores relacionados à neuropatogênese da DP é o estresse oxidativo resultante da excessiva geração de EROs. Diversos processos celulares são estimulados por baixas concentrações de EROs. Entretanto, estas espécies podem aumentar a peroxidação lipídica e modificar proteínas e ácidos nucleicos, resultando em neurodegeneração (ZOROV *et al.*, 2005). O estresse oxidativo associado ao metabolismo da dopamina tem sido relacionado à produção de espécies reativas e de metabólitos tóxicos nos neurônios dopaminérgicos, onde a dopamina funcionaria como uma neurotoxina endógena, favorecendo a exposição neuronal a danos oxidativos. Este seria um dos mais relevantes fatores envolvidos na fisiopatologia da DP (JENNER, 2004). Como parte do processo de oxidação não enzimática, a dopamina perde um elétron levando à formação de radical dopamina semiquinona, que pode oxidar proteínas e modificar o DNA. A sequência de eventos, com perda de mais um elétron, conduz à formação de dopamina *orto*-quinona, que pode reagir com tióis e proteínas. Acrescente-se que a presença de metais de transição e/ou oxigênio molecular contribui para a formação de EROs (SULZER; ZECCA, 2000).

A oxidação enzimática da dopamina, por ação da MAO-A ou MAO-B, leva à formação do aldeído correspondente, DOPAL (3,4-di-hidroxifenilacetaldeído) e à geração de H_2O_2 , que por sua vez, em presença de Fe^{2+} , participa da produção de radicais hidroxila. O DOPAL é um aldeído extremamente reativo que apresenta toxicidade bem superior à dopamina, sendo que a formação de EROs na oxidação do DOPAL está relacionado ao seu envolvimento na DP (ANDERSON *et al.*, 2011).

Evidências da literatura demonstram que alterações na concentração de monoaminas podem causar prejuízos em diversas funções fisiológicas. A atividade anormal da MAO-B tem sido associada a várias patologias neurológicas, como a Doença de Parkinson (DP) e Doença de Alzheimer, ao passo que a MAO-A está relacionada à problemas psiquiátricos, como a depressão e a ansiedade (YOUUDIM; BAKHLE, 2006).

É importante esclarecer que a regulação destas enzimas é fator de grande relevância. Desta forma, inibidores da MAO-A são empregados no tratamento da depressão, enquanto que inibidores seletivos da MAO-B são utilizados na terapêutica da Doença de Parkinson (ADLER, 2011). Assim, dois inibidores seletivos são utilizados no tratamento da DP: selegilina e rasagilina. Inibidores seletivos da MAO-B, quando empregados nas doses usuais

recomendadas, não inibem de maneira significativa o metabolismo periférico das catecolaminas, podendo ser usados em conjunto com levodopa sem riscos adicionais aos pacientes (ELMER; BERTONI, 2008).

Entretanto, o tratamento da Doença de Parkinson com inibidores seletivos da MAO-B, a exemplo da selegilina, é mais efetiva para pacientes mais jovens e em estágio iniciais da doença, sendo que os portadores da forma avançada da doença, poderiam sofrer um incremento dos efeitos adversos (motores e cognitivos) da levodopa. Adicionalmente, a anfetamina e metanfetamina, metabólitos da selegilina, podem causar sintomas como insônia e ansiedade. Outra consequência da inibição da MAO-B cerebral, seria a diminuição global do catabolismo da dopamina, com subsequente redução da formação de radicais livres, oferecendo um efeito neuroprotetor (GOODMAN; GILMAN, 2012). Neste contexto, alguns estudos têm demonstrado a ação neuroprotetora de inibidores da MAO-B em diversos modelos da DP (LANGSTON *et al.*, 1984; JENNER, 2004), além de atividade antioxidante e antiapoptótica (YOUDIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006).

A partir destas considerações, torna-se relevante a pesquisa por compostos naturais e seus constituintes que exerçam atividade sobre enzimas importantes na função do Sistema Nervoso Central e que apresentem uma perspectiva para alternativas de tratamento efetivas e com menos efeitos adversos.

1.3 Potencial antimicrobiano de produtos naturais

Reconhecidamente as EROs e ERNs são geradas durante a fagocitose e são importantes para neutralizar a invasão microbiana, participando da defesa do organismo contra o processo infeccioso. Entretanto, sua produção aumentada pode ser responsável por danos inflamatórios (GOMES *et al.*, 2008). A ativação do sistema imune é um importante mecanismo de defesa contra infecções microbianas, sendo que na presença de infecção, a estimulação de mediadores pró-inflamatórios promove o recrutamento de células de defesa, a exemplo de neutrófilos e monócitos para combater esse estágio (GARCIA VIDAL; CARATTALÁ, 2012; KUMAR; SHAMA, 2010). Entretanto, uma resposta inflamatória exacerbada decorrente, por exemplo, do estresse oxidativo, pode provocar danos aos tecidos, aumentando a suscetibilidade a doenças infecciosas (KUMANOTO, 2011), podendo também, comprometer o tratamento antimicrobiano (ZELANTE *et al.*, 2007).

Nesse contexto, diferentes extratos de plantas e seus constituintes com capacidade antioxidante tem despertado o interesse de pesquisadores para a investigação de propriedades antimicrobianas. Produtos naturais tem representado uma modalidade alternativa ao uso de medicamentos sintéticos, em especial, pela perspectiva de menores efeitos adversos além de menor toxicidade, interações entre os fármacos e mecanismos de resistência microbiana desencadeada em parte, pelo uso indiscriminado ou mesmo incorreto de antimicrobianos (COLOMBO *et al.*, 2006; PIGRAU; ALMIRANTE, 2009).

Neste cenário, as infecções provocadas por fungos continuam influenciando na morbidade e mortalidade mundiais, particularmente, em pacientes imunodeprimidos. Espécies de *Candida* estão envolvidas na ocorrência de doenças oportunistas, sendo que *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* representam cerca de 95-97% das infecções invasivas relacionadas a este gênero (PEMÁN; SALAVERT, 2012). É importante ressaltar que infecções por *C. albicans* acometem cerca de 17% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Este fato apoia a relevância da descoberta de novas drogas antimicrobianas mais efetivas para o tratamento (RAPP, 2004; GULLO, 2009).

De forma similar, as infecções bacterianas e de maneira particular, às causadas por bactérias resistentes respondem por uma parcela significativa de morbidade e óbitos em todo o mundo. Vale ressaltar, que as bactérias possuem a capacidade de adquirir resistência aos medicamentos utilizados para tratamento e transmiti-la de forma muito rápida. Mesmo com os consideráveis avanços tecnológicos na indústria farmacêutica, o desenvolvimento de novos fármacos não tem conseguido acompanhar a acelerada evolução microbiana (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas estão envolvidas nas infecções em humanos. Os patógenos como o *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* são bactérias Gram positivas, que estão frequentemente relacionadas com infecções importantes. O *S. aureus* é frequentemente encontrado colonizando a microbiota natural da pele, sendo que a perda da integridade cutânea ou alterações no estado imunológico podem levar ao surgimento de infecções, estando ainda envolvido em infecções como abscessos, furunculose, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana, além de infecções nosocomiais associadas a intervenções cirúrgicas (LOWY, 1998; VERHOEFF *et al.*, 1999).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo aeróbico, relacionado a infecções resistentes a antibióticos usados comumente em seu tratamento, sendo

potencialmente infectante e associada a doenças infecciosas de caráter oportunista (MARTIN; YOST, 2011). A *Escherichia coli*, por sua vez, é uma bactéria Gram-negativa, causadora de infecções importantes, conhecida por produzir enterotoxinas, responsáveis por diarreias infecciosas, de relevância clínica, especialmente, em crianças menores de 1 ano de idade (KONOWALCHUK; DICKIE; STAVRIC, 1977). Diferentes cepas de *E. coli* estão relacionadas a infecções do trato urinário, intestinal, de ferida cirúrgica e septicemia (GERMANO; GERMANO, 2011).

É importante esclarecer que os antimicrobianos apresentam diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, a toxicidade seletiva, a inibição da síntese da parede celular e de sua função, a inibição da síntese proteica ou da síntese dos ácidos nucleicos. Desse modo, os betalactâmicos, como o imipenem, são inibidores seletivos da síntese da parede celular, sendo ativos contra bactérias em crescimento. O fármaco betalactâmico se liga a receptores celulares, inibindo a reação de transpeptidação, conduzindo ao bloqueio da síntese do peptidoglicano (polímero complexo e distinto, constituinte da parede celular das bactérias). Já os aminoglicosídeos, ligam-se à subunidade ribossomal 30S antes da formação do ribossomo microbiano, bloqueiam a atividade normal do complexo de iniciação para a formação de peptídeos e conduzem à formação de uma proteína não funcional. De maneira diferente, as quinolonas inibem a replicação do DNA bacteriano interferindo na ação da DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV durante o crescimento e a reprodução bacteriana (BROOKS *et al.*, 2012).

Existem vários mecanismos através dos quais os microrganismos podem exibir resistências aos antimicrobianos. De uma maneira geral, os microrganismos podem produzir enzimas que destroem o fármaco ativo; podem também, alterar sua permeabilidade ao fármaco antimicrobiano; desenvolver um alvo estrutural alterado para o fármaco; ou ainda uma via metabólica alterada, a qual omite a reação inibida pelo fármaco, e ainda possuem a capacidade de adquirir resistência por elaborarem uma enzima alterada que possui menor afinidade pelo fármaco (BROOKS *et al.*, 2012). Um importante mecanismo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, penicilinas e cefalosporinas consiste na inativação do fármaco por enzimas. A resistência aos aminoglicosídeos também pode depender da ausência de permeabilidade a esses fármacos em consequência de alterações na membrana externa e comprometimento do transporte ativo para o interior da célula (JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004). A inativação enzimática também ocorre em algumas enzimas conhecidas como beta-lactamases, as quais inativam penicilinas e cefalosporinas. Essas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas,

aeróbicas e anaeróbicas, e provocam a ruptura do anel beta-lactâmico, resultando na inativação do antibiótico. As modificações moleculares para impedir a ligação do antibiótico ao seu sítio de ligação ocorrem com beta-lactâmicos. Esse tipo de resistência também ocorre em quinolonas, onde a célula bacteriana modifica o sítio de ligação na DNA-girase ou topoisomerase II (GEORGOPAPADAKOU; LIU, 1990).

Muito embora os mecanismos de ação de antimicrobianos sejam úteis por alterar a estrutura celular, o metabolismo ou enzimas específicas para bactérias, a resistência bacteriana é mediada por situações que alteram o alvo dos fármacos ou reduzem a permeabilidade da célula bacteriana ao fármaco ou ainda, promovem o efluxo da droga, com subsequente retirada do antibiótico para o meio extracelular de forma mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para bloquear as funções celulares (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2007). Dentre os principais mecanismos de resistência fúngica estão também o aumento do efluxo celular do fármaco, a diminuição na sua captação, a sua modificação ou degradação e ainda, alterações nos sítios de ação (SEGATO, 2008).

Em se tratando de bactérias Gram-negativas, a diminuição na permeabilidade da parede celular representa um importante mecanismo de resistência aos antibióticos (LIVERMORE, 2003). Nessa perspectiva, várias plantas têm sido pesquisadas não somente pelo potencial antimicrobiano direto, mas também, pela capacidade de modificar a ação de antibióticos (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Os mecanismos de extratos de plantas responsáveis pela ação inibitória do crescimento bacteriano se devem, em parte, à natureza hidrofóbica de alguns de seus componentes. (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999).

Assim, alguns componentes presentes em extratos de plantas podem aumentar a permeabilidade celular aos antibióticos, demonstrando um efeito de sinergismo com estes fármacos (BURT, 2004). Estes efeitos podem ser observados através da combinação de antibióticos com produtos naturais em concentrações sub-inibitórias (COUTINHO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009). Esta estratégia é denominada de *shotgun herbs*, na qual se utiliza da combinação de plantas e fármacos, podendo ser empregada uma terapêutica com um ou mais extratos associados, os quais podem ter efeito em vários alvos. Nessa perspectiva, diferentes terapêuticas podem ser aplicadas com sinergismo ou antagonismo de substâncias naturais com antimicrobianos (WAGNER; ULRICH-MERZENICHI, 2009; COUTINHO *et al.*, 2010).

Pesquisas revelam que plantas ricas em compostos fenólicos e flavonoides possuem atividade antimicrobiana *in vitro* (TEPE *et al.*, 2004). A atividade antifúngica de flavonoides tem sido relacionada à propriedade destes compostos de formar complexos com proteínas solúveis das células fúngicas e ainda, a sua natureza lipofílica, tem a capacidade de romper a membrana destas células (ARIF; MANDAL; DABUR, 2011; SALAS *et al.*, 2011).

Constitui, portanto um desafio para pesquisadores, a investigação com vistas à descoberta de novos agentes terapêuticos contra infecções provocadas por patógenos multirresistentes, sendo que neste aspecto, os produtos naturais ganham especial importância (CHEN *et al.*, 2005; FOWLER *et al.*, 2011).

1.4 Considerações gerais sobre Silimarina e Silibinina

Os produtos naturais assumem papel relevante para a descoberta de drogas, estando ao longo da evolução da humanidade, presentes no uso para prevenção e tratamento de doenças (DAVID; DAVID, 2006; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003), o que certamente tem mobilizado o interesse de pesquisadores de diversas áreas no sentido de identificar propriedades bioativas. O uso de plantas, extratos e seus constituintes químicos para o tratamento de doenças representa uma importante modalidade terapêutica (GILANI; ATA-UR-RAHMAN, 2005).

Dentre os constituintes fitoquímicos, os flavonoides geram um interesse particular pelo seu efeito antioxidante. Esta atividade está relacionada à estrutura química destes compostos, como por exemplo, os hidrogênios dos grupos hidroxila e as duplas ligações dos anéis benzênicos. De maneira geral, os compostos fenólicos são antioxidantes que doam elétrons e desta forma, impedem a iniciação dos danos provocados por radicais livres, sendo extremamente sensíveis à oxidação enzimática e não-enzimática (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Os flavonoides exercem seus efeitos antioxidantes pela capacidade de sequestrar radicais livres, prevenir a progressão da formação de radicais, quelar metais de transição como o Fe^{2+} e o Cu^+ , bloquear a propagação do processo de peroxidação lipídica, com consequente diminuição do dano oxidativo e morte celular (KYUNGMI; EBELER, 2008; DUGAS *et al.*, 2000).

A espécie *Silybum marianum* (L.) Gaertn., conhecida popularmente como Cardo Mariano, Cardo Santo e Serralha-de-folhas-pintadas, tem sido largamente utilizada na

medicina popular para o tratamento de doenças hepáticas. Pertencente à família Asteraceae, é nativa do Mediterrâneo e cultivada na Europa e nas Américas (NENCINE; GIORGI; MICHELI, 2007; VALENZUELA; GUERRA, 1985).

A partir de *Silybum marianum* se extrai a Silimarina, um extrato-padrão, o qual é formado por 70% de flavonolignanas (silibinina ou silibina, isosilibina, silicristina silidianina e dehidrosilibina) e 30% restantes são constituintes químicos indefinidos, correspondendo a compostos polifenóis, poliméricos e oxidados (KREN; WALTEROVA, 2005). A silibina ou silibinina é o seu constituinte majoritário, compreendendo de 50 a 70% (LOGUERCIO; FESTI, 2011).

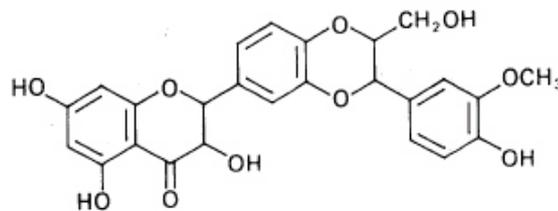


Figura 1 – Estrutura química da Silibinina.

Fonte: Adaptado de Lu *et al.*, (2009).

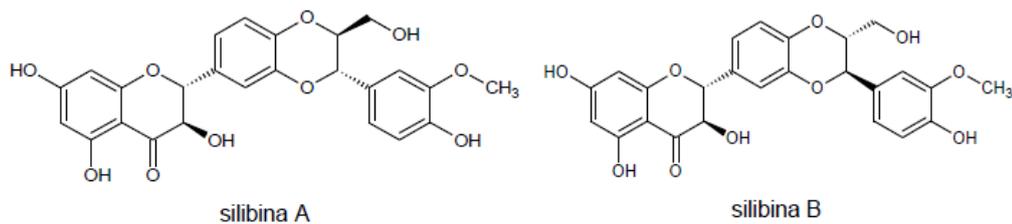


Figura 2 – Estrutura química da Silibina A e Silibina B.

Fonte: Adaptado de Santos (2014).

A Silimarina foi obtida de sementes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pela primeira vez em 1968 (SIMÁNEK *et al.*, 2000). Pesquisas demonstram que a absorção oral da Silimarina é cerca de 23-47% (DIXIT *et al.*, 2007) e o pico na concentração plasmática desta substância é em torno de 4-6h. O seu uso é considerado seguro, sem efeitos adversos secundários mesmo em altas doses, tanto em animais quanto em humanos (SALLER;

MEIER; BRIGNOLI, 2001). Estudos *in vitro* sobre o efeito de Silibinina na viabilidade de monócitos humanos não demonstraram citotoxicidade (BANNWART *et al.*, 2010).

A silimarina possui várias propriedades farmacológicas, dentre as quais podemos citar ação anti-inflamatória (MIADONNA *et al.*, 1987), antitumoral (KATIYAR *et al.*, 1997), antifibrótica e citoprotetora (BOIGK *et al.*, 1997). Sua capacidade antioxidante tem sido atribuída às flavonolignanas e polifenóis presentes em sua composição (VALENZUELA *et al.*, 1989; NENCINE; GIORGI; MICHELI, 2007). Estudos apontam que este extrato possui habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e assim, exercer um efeito neuroprotetor (WANG *et al.*, 2002).

Dados da literatura mostram que a Silibinina ou silibina, constituinte majoritário da Silimarina apresenta importantes atividades farmacológicas, como neuroproteção (SAKAI *et al.*, 2001) e nefroproteção (DIETZMANN *et al.*, 2002), além de ser apontado pelos seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório, estabilizador de membrana e antiapoptótico (LIGERET *et al.*, 2008).

Embora vários estudos *in vitro e in vivo* indiquem que a Silimarina possui atividade antioxidante, os mecanismos moleculares envolvidos nos seus efeitos ainda não estão bem esclarecidos (MANDEGARY *et al.*, 2013). Entretanto, este composto parece exercer efeito na supressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), reconhecidamente envolvido na transcrição de genes relacionados à resposta imune e inflamatória (ATAWIA, *et al.*, 2013). Admite-se, portanto, que estudos envolvendo o efeito da Silimarina na proteção a doenças neurodegenerativas ainda são escassos.

A Silimarina também demonstrou eficiência na proteção de neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxicidade induzida por lipopolissacarídeos, na inibição da ativação da micróglia e na liberação de mediadores inflamatórios (WANG *et al.*, 2002). Considerando que a micróglia está envolvida no processo de defesa cerebral, a sua ativação conduz à liberação de fatores inflamatórios, radicais livres e eicosanóides, os quais contribuem para a neurodegeneração da mesma (MINGHETTI; LEVI, 1998).

Um estudo realizado com Silimarina e melatonina concluiu que ambos os compostos apresentaram neuroproteção, a qual esteve relacionada com a diminuição na expressão gênica de vários moduladores do estresse oxidativo, do dano apoptótico, inflamatório e da disfunção mitocondrial diante da exposição a pesticidas como o Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-dicloreto de bipyridilo) e o Maneb (etileno bis-ditiocarbamato de manganês), modelos estes relacionados à Doença de Parkinson (SINGHAL *et al.*, 2013).

Diante deste cenário, o estresse oxidativo tem sido relacionado à etiologia de importantes doenças, o que certamente tem mobilizado o interesse de pesquisadores com vistas à descoberta de substâncias com potencial antioxidante, incluídas nesta perspectiva, fármacos para o tratamento mais efetivo das doenças neurológicas crônico-degenerativas.

Vale destacar também, que o excesso de radicais livres predispõe ao surgimento de processos infecciosos, podendo também trazer prejuízos ao tratamento de infecções, sendo vislumbrada a busca por substâncias derivadas de produtos naturais que possam modificar a ação de fármacos empregados na terapêutica antimicrobiana habitual.

Compreende-se que a avaliação do efeito *in vitro* da Silimarina sobre o *status* oxidativo e atividade de enzimas com significativa importância em nível de Sistema Nervoso Central, bem como, da atividade antimicrobiana e modulatória de fármacos antimicrobianas da Silimarina e Silibinina, possa impulsionar novas pesquisas com estes produtos com vistas à descoberta de modalidades de tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo consiste prioritariamente, em verificar a influência da Silimarina, bem como de seu constituinte majoritário, sobre o *status* oxidativo e enzimático envolvendo a MAO e a Na⁺/K⁺-ATPase, sua ação antimicrobiana, ação sobre o efeito de fármacos antimicrobianos, na perspectiva de utilização da Silimarina como substância adjuvante ao tratamento de doenças neurológicas e na terapêutica a infecções resistentes.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o extrato-padrão da Silimarina através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

- Avaliar a influência *in vitro* da Silimarina quanto a:
 - capacidade antioxidante total e a ação sequestradora do radical DPPH;
 - proteção contra a peroxidação lipídica, pelo método de TBARS diante de pró-oxidantes;
 - atividade da catalase e a oxidação de grupos tióis proteicos e não proteicos na presença de pró-oxidantes;
 - atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e monoamino oxidase.

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Silimarina e da Silibinina contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e diferentes linhagens fúngicas (*Candida albicans*, *Candida kruzei* e *Candida tropicalis*);

- Determinar a atividade modulatória da Silimarina e da Silibinina em associação a drogas antimicrobianas contra cepas multirresistentes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e de *C. albicans*, *C. kruzei* e *C. tropicalis*.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados na forma de dois artigos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências destes, encontram-se estruturados de acordo com as normas das respectivas revistas nas quais foram publicados.

3.1 Artigo 1

Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase in vitro

Dayanne Rakelly de Oliveira; Larissa Finger Schaffer; Alcindo Busanello; Caroline Pilecco Barbosa; Luis Ricardo Peroza; Catiúscia Molz de Freitas; Barbara Nunes Krum; Getúlio Nicola Bressan; Aline Augusti Boligon; Margareth Linde Athayde; Irwin Rose Alencar de Menezes; Roselei Fachinetto

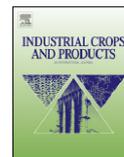
Periódico: Industrial Crops and Products, (2015), p. 347-355.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase *in vitro*



Dayanne Rakelly de Oliveira^{a,e}, Larissa Finger Schaffer^b, Alcindo Busanello^b,
Caroline Pilecco Barbosa^c, Luis Ricardo Peroza^a, Catuscia Molz de Freitas^a,
Barbara Nunes Krum^a, Getúlio Nicola Bressan^c, Aline Augusti Boligon^d,
Margareth Linde Athayde^d, Irwin Rose Alencar de Menezes^e, Roselei Fachinnetto^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^c Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^d Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^e Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2014

Received in revised form 14 March 2015

Accepted 17 March 2015

Available online 29 March 2015

Keywords:

Silymarin

Oxidative stress

Antioxidant

MAO

Na⁺/K⁺-ATPase

Lipid peroxidation

ABSTRACT

Silymarin is an extract of the milk thistle seeds *Silybum marianum* (L.) Gaerth used to treat liver disorders and recently reported as a putative neuroprotective agent against neurologic diseases including Parkinson's disease. However, its action mechanism is not completely investigated. In the present study, we investigated *in vitro* the antioxidant effects of silymarin as well as on Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase (MAO) activity in rat brain homogenate. HPLC fingerprinting of silymarin extract revealed the main component present is silibinin. Furthermore, silymarin showed a total antioxidant capacity and ability to scavenging the DPPH radical dependent of the concentration used. Silymarin decreased lipid peroxidation induced by both pro-oxidants tested, sodium nitroprusside (SNP) and iron (Fe²⁺), respectively. Silymarin also avoided the loss in activity of catalase and protein and non-protein thiol oxidation pre-incubated with SNP or Fe²⁺. With regard to MAO and Na⁺/K⁺-ATPase activity, silymarin inhibited MAO in a noncompetitive way with a higher potency to MAO-B and could activate Na⁺/K⁺-ATPase. Taken together, our *in vitro* data suggest that neuroprotective effects of silymarin may involve antioxidant and modulatory effects on MAO and Na⁺/K⁺-ATPase activity.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The generation of reactive oxygen species (ROS) is a physiological process, which is derived from aerobic metabolism. However, the overproduction of ROS can lead to an imbalance in the antioxidant defense system, causing a condition known as oxidative stress (Halliwell, 2011). In this context, some tissues and organs possess a greater susceptibility to increase of ROS. The brain is a particularly vulnerable organ because it has low levels of antioxidant defense, high levels of polyunsaturated fatty acids and uses large amounts of oxygen which became the central nervous system more vulner-

able to the effects caused by ROS (Halliwell et al., 1992; Sultana and Butterfield, 2004).

It is suggested that oxidative stress plays a major role in the progression of a wide range of neurological disturbances such as Parkinson's disease, Huntington's disease, Alzheimer's disease and others (Santos et al., 2014; Schapira et al., 2014) being Na⁺/K⁺-ATPase considered a potent neuroprotective modulator (Zhang et al., 2013). Na⁺/K⁺-ATPase is a heterodimeric membrane protein which maintains the electrochemical gradients for Na⁺ and K⁺ across cell membranes in all tissues (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003) and is sensible to redox status of the cells (Figtree et al., 2012). Some studies have suggested that, Na⁺/K⁺-ATPase could be a target of natural compounds (Kurella et al., 1999; Almaliti et al., 2013). Another enzyme considered as an important target to neurodegenerative disease, especially Parkinson's disease is monoamine oxidase (MAO) (Youdim and Bakhle, 2006). MAO has two isoforms, MAO-A and MAO-B, distributed along of tissues being the

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Tel.: +55 3220 8096; fax: +55 3220 8241.

E-mail address: roseleirf@gmail.com (R. Fachinnetto).

inhibition of MAO-B related to ameliorating Parkinson's disease (Youdim and Bakhle, 2006) while, the inhibition of MAO-A could promote the protection against cell apoptosis (Ou et al., 2006).

Literature data has demonstrated that natural compounds with antioxidant activity could represent important tool for decreasing the progression of neurodegenerative diseases in animal models as well as in humans (Busanello et al., 2011, 2012; Lu et al., 2009; Peroza et al., 2013; Rasool et al., 2014; Reckziegel et al., 2013). In accordance, silymarin is an extract composed by flavonoids from the plant *Silybum marianum* (Pepping, 1999) largely used to treat liver diseases (Abenavoli et al., 2010). Silymarin is a lipophilic extract basically composed by a mixture of lignan-derived flavonols, containing mainly silibinin (silybin) followed by silydianin, silychristin, and isosilybin (Kvasnicka et al., 2003). Silymarin has pharmacological properties as anti-hepatotoxic agent (Saller et al., 2001), anti-inflammatory (Miadonna et al., 1987), anti-tumor (Katiyar et al., 1997), antifibrotic and cytoprotective (Boigk et al., 1997). Furthermore, silymarin has recently been reported to be a putative neuroprotective agent against several neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (Lu et al., 2009), Parkinson's disease (Singhal et al., 2011), and cerebral ischemia (Raza et al., 2011). Moreover, silymarin compounds have the ability to cross the blood brain barrier, and thus, exert a neuroprotective effect (Wang et al., 2002). Literature data suggest that antioxidant property of silymarin may contribute to its pharmacological properties (Galhardi et al., 2009) but it is not an exclusive mechanism (Borah et al., 2013).

Considering that the targets of silymarin are not completely elucidated, this study investigated *in vitro* the possible antioxidant effects of silymarin as well as on Na^+/K^+ -ATPase and MAO activity.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Silymarin was commercially acquired from DEG[®] importation (Brazil). Other reagents were from analytical grade.

2.2. Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5 μm diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 15% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively, following the method described by Abbas et al. (2014) with slight modifications. Silymarin extract was analyzed at a concentration of 2.4 mg/mL, the identification of silibinin (A and B), gallic acid, ellagic acid and caffeic acid were performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume 40 μL and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 280 nm for silibinin (A and B) and 327 nm caffeic and ellagic acids. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. A stock solution of standards references was prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.250 mg/mL. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standard and by DAD spectra (200–500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 11945 + 1268.4 (r = 0.9997)$, caffeic acid: $Y = 13407 + 1361.8 (r = 0.9992)$, ellagic acid: $Y = 13485 + 1195.9 (r = 0.9993)$, silibinin A: $Y = 12683 + 1185.9 (r = 0.9999)$ and silibinin B: $Y = 13045x + 1376.1 (r = 0.9995)$. All chromatography operations were carried out at

ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as $3.3-10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (Bologon et al., 2013).

2.3. Determination of total phenolic compounds

The total phenolic content was determined by mixing the silymarin at concentration of 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with 10% Folin-Ciocalteu's reagent (v/v), which was followed by the addition of 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3). The reaction mixture was incubated at 45 $^\circ\text{C}$ for 15 min, and the absorbance was measured at 765 nm. GA was used as standard for phenolic compounds (Singleton et al., 1999).

2.4. Total antioxidant capacity assay

The total antioxidant capacity of the silymarin was evaluated by the phosphomolybdenum method as previously described by Prieto et al. (1999). Silymarin at a concentration range of 10–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was combined with reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The reaction was incubated in a water bath at 95 $^\circ\text{C}$ for 90 min. After cooling the mixture to room temperature, the absorbance was measured at 695 nm. The ascorbic acid (1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control.

2.5. DPPH radical scavenging activity assay

The ability of silymarin in to scavenging the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was performed in accordance with Choi et al. (2002). Briefly, DPPH 0.15 mM was added to a medium containing different concentrations of silymarin (10–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The medium was incubated for 30 min at room temperature and the decrease in absorbance measured at 518 nm depicted the scavenging activity of silymarin against DPPH radical (Brand Williams et al., 1995). The values are expressed as percentage of inhibition of DPPH absorbance in relation to the control values without the silymarin. The ascorbic acid (5–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control.

2.6. Animals

Male Wistar rats weighing 220–250 g from breeding colony (Animal House, UFSM, Brazil) were kept in cages with four or five animals each with continuous access to food and water. The cages were maintained into ventilated shelving in a room with temperature-controlled (22 ± 1 $^\circ\text{C}$) and on a 12-h light/dark cycle with the lights on at 7:00 am. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by ethical commission of UFSM under the number 018/2014.

2.6.1. Tissue preparation

Rats were anesthetized with a solution of ketamine:xylazine (90:12 mg/kg, respectively). After, the animals were decapitated and whole brain tissue was rapidly dissected, placed on ice and weighed. Tissue was immediately homogenized in 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 (1:10 - w:v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4000 \times g to yield a pellet, which was discarded, and the low-speed supernatant (S1) was used for *in vitro* analysis.

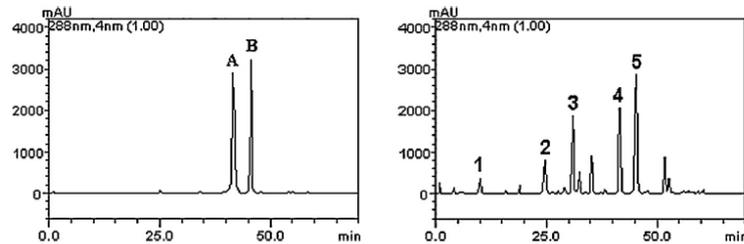


Fig. 1. Representative high performance liquid chromatography profile of silymarin, detection UV was at 288 nm. Gallic acid (peak 1), caffeic acid (peak 2), ellagic acid (peak 3), silibinin A (peak 4) and silibinin B (peak 5).

2.7. TBARS production

The *in vitro* potential of silymarin in preventing lipid peroxidation was determined by pre-incubating a 100 μ L aliquot of S1 for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, with pro-oxidant agents (SNP 5 μ M or FeSO₄ 10 μ M) in the presence or absence of different concentrations of silymarin (3–100 μ g/mL). Immediately after the pre-incubation, 100 μ L of 8.1% SDS, 500 μ L of acetic acid (pH 3.4) and 500 μ L of thiobarbituric acid (TBA) 0.6% were added to the mixture reaction, followed by incubation for 1 h at 100 $^{\circ}$ C and the absorbance was measured at 532 nm. Standard curve of MDA was made for each experiment. The values are expressed as nmol MDA/g of tissue (Ohkawa et al., 1979).

2.8. Catalase

The activity of antioxidant enzyme catalase was evaluated after pre-incubation 200 μ L aliquot of S1 for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, with pro-oxidant agents (SNP 5 μ M or FeSO₄ 10 μ M) in the presence or absence of different concentrations of silymarin (3–100 μ g/mL). After, the reaction mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min and an aliquot of 50 μ L supernatant was used for measuring catalase activity by the previously described method of Aebi (1984) which monitors the disappearance of H₂O₂ at 240 nm under a medium containing phosphate buffer pH 7.0 at 25 $^{\circ}$ C. The enzymatic activity was expressed in μ mol de H₂O₂/g of tissue/min.

2.9. Thiol oxidation

In this experiment, an aliquot of S1 was pre-incubated at same experimental conditions of catalase (describe above) and after 1 h, the protein and non-protein thiol levels were determined according to Ellman, 1959 and Schaffer et al. (2013). For protein thiol levels an aliquot of 50 μ L of the pre-incubation mixture was used. For non-protein thiol levels, 10% TCA was added 1:1 to an aliquot of 50 μ L of the pre-incubation mixture, centrifuged at 3,000 rpm for 10 min and the supernatants were then used. Ellman's reagent 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)(DTNB) was added to the samples of protein and nonprotein thiol and the chromogen was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results of protein and non-protein thiols levels were expressed as μ mol protein thiol/g tissue and μ mol non-protein thiol/g tissue, respectively.

2.10. Na⁺/K⁺-ATPase activity

The activity of enzyme Na⁺/K⁺-ATPase was determined as described by Fiske and Subbarow, 1925 with some modifications, using S1 from rat brain as previously described. Briefly, the assay medium consisted of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 125 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl₂, and 50 μ g of protein in the presence or absence of 100 μ M ouabain and with different concentrations of

Table 1
Composition of Silymarin.

Compounds	Silymarin mg/g	LOD μ g/mL	LOQ μ g/mL
Gallic acid	2.16 \pm 0.01 a	0.009	0.029
Caffeic acid	5.09 \pm 0.03 b	0.032	0.105
Ellagic acid	11.68 \pm 0.02 c	0.018	0.059
Silibinin A	12.75 \pm 0.01 c	0.011	0.034
Silibinin B	15.93 \pm 0.03 d	0.027	0.890

Results are expressed as mean \pm standard deviations(SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

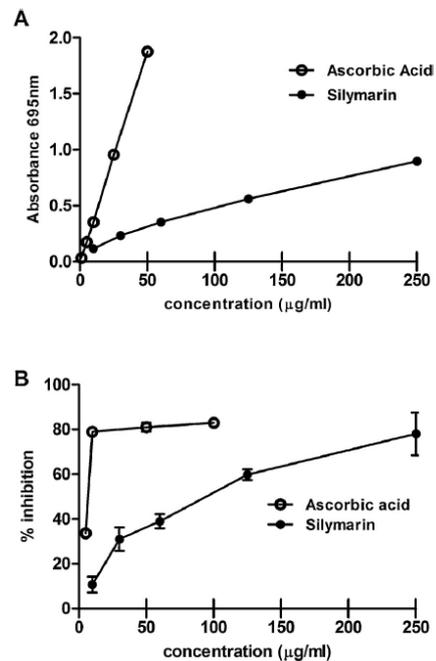


Fig. 2. (A) Total antioxidant capacity of the silymarin. Values are expressed as absorbance means \pm SEM of 3 individual experiments. (B) Effect of silymarin on the inhibition of DPPH radical. Values are expressed as absorbance means \pm SEM of 3 individual experiments.

silymarin (3–300 μ g/mL). The mixture was pre-incubated during 10 min at 37 $^{\circ}$ C and the reaction started by addition of 3 mM adenosine triphosphate (pH 6.8). After 30 min at 37 $^{\circ}$ C, the reaction was stopped by addition of color reagent (2% ammonium molybdate and 5% Triton X-100). Saturating substrate concentrations were

used. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow, 1925 using KH_2PO_4 as reference standard. The reaction product was determined at 450 nm. Na^+/K^+ -ATPase activity was expressed in $\mu\text{mol Pi}/\text{mg protein}/\text{min}$.

2.11. Determination of the kinetic parameters of MAO inhibition in vitro

Silymarin was tested for its *in vitro* inhibitory potential on MAO-A and MAO-B activities in rat brain mitochondrial preparations by a fluorometric method using kynuramine as a substrate, as previously described (Villarinho et al., 2012). Briefly, assays were performed in duplicate in a final volume of 500 μL containing 0.25 mg of protein and incubated at 37 °C for 30 min. Activities of the A and B isoforms were isolated pharmacologically by incorporating 250 nM pargyline (selective MAO-B inhibitor) or 250 nM clorgyline (selective MAO-A inhibitor) into the reaction mix. The reaction mixture (containing mitochondrial fractions, silymarin and inhibitors) was pre-incubated at 37 °C for 10 min, and the reaction was started by the addition of 50 μL of kynuramine (90 μM for MAO-A and 60 μM for MAO-B). Also, silymarin was tested at a concentration range of 1 to 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the IC_{50} and K_i values for both MAO isoforms were determined.

For kinetic experiments, various concentrations of kynuramine (1–100 μM) were used, and the MAO-A and MAO-B activity was determined in the absence or presence of different concentrations of silymarin (30–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in order to calculate K_m and V_{max} values.

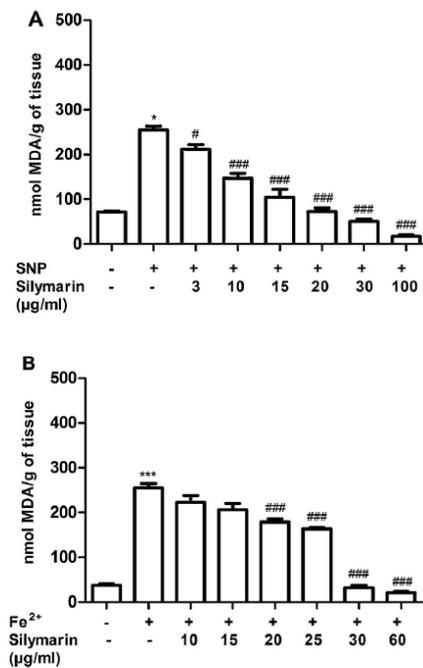


Fig. 3. Effects of silymarin on (A) SNP (5 μM)- or (B) Fe^{2+} (10 μM)-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. Data show mean \pm SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Dunnett's test. *, ***Significant differences compared to basal (without pro-oxidant agent) and #, ### significant differences in relation to induced by Fe^{2+} or SNP.

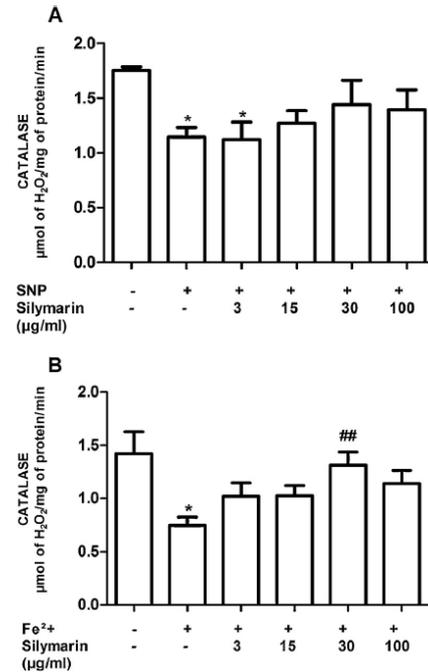


Fig. 4. Effects of silymarin on catalase levels of rat brain homogenates pre-incubated with (A) Fe^{2+} (10 μM) or (B) SNP (5 μM). Data show mean \pm SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *Significant differences compared to basal and ## significant difference in relation to pre-incubated with pro-oxidant agent.

2.12. Protein determination

The protein content was determined according to Lowry (1951), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.13. Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by a post hoc test when appropriate. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$. The results of MAO were expressed as the means \pm SEM. The results were expressed as means \pm SEM. K_m ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and V_{max} (nmol/min/mg protein) values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis–Menten equation.

3. Results

3.1. HPLC fingerprint and phenolic compounds of silymarin

HPLC fingerprinting of Silymarin extract revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 10.19$ min; peak 1), caffeic acid ($t_R = 24.97$ min; peak 2), ellagic acid ($t_R = 31.76$ min; peak 3), silibinin A ($t_R = 42.17$ min; peak 4) and silibinin B ($t_R = 45.89$ min; peak 5) (Fig. 1 and Table 1). As it was previously demonstrated (Zholobenko and Modriansky, 2014) the determination of phenolic compounds showed silymarin is composed basically by phenolic compounds (999 \pm 12.13 μg gallic acid equivalent/mg of silymarin).

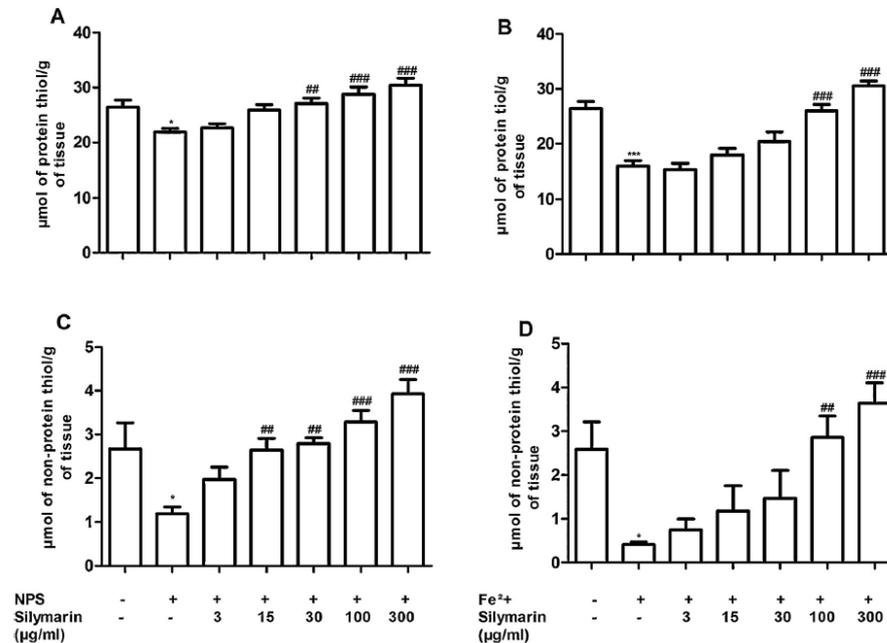


Fig. 5. Effects of silymarin on protein (A and B) and non-protein (C and D) thiol content of rat brain homogenate incubated with SNP (5 µM) or Fe²⁺ (10 µM) different pro-oxidant agents. Data show mean + SEM from three to four independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *, *** significant differences compared to basal and ##, ### significant differences in relation to pre-incubated with pro-oxidant agent.

3.2. Total antioxidant and DPPH radical scavenger capacity of silymarin

Silymarin showed a total antioxidant capacity dependent of the concentration being 250 µg/mL of Silymarin equivalent to 25 µg/mL of ascorbic acid (Fig. 2A). Furthermore, silymarin was evaluated on its ability to scavenging the DPPH radical, and it presented significant antioxidant effect with an IC₅₀ of 92.36 (µg/mL) ± 15.88 (Fig. 2B).

3.3. Effects of silymarin on SNP and Fe²⁺-induced lipid peroxidation

SNP and Fe²⁺ increased brain lipid peroxidation as demonstrated by elevation in MDA levels ($p < 0.05$) when compared to basal levels. Silymarin decreased lipid peroxidation induced by both pro-oxidants, SNP (IC₅₀ = 19.33 ± 4.55 µg/mL) and Fe²⁺ (IC₅₀ = 28.2 ± 8.06 µg/mL) in a concentration dependent manner (Fig. 3A and B, respectively).

3.4. Effects of silymarin on SNP and Fe²⁺-induced loss in catalase activity

The pre-incubation of homogenates with SNP or Fe²⁺ decreased the catalase activity when compared to control ($p < 0.05$; Fig. 4A and B). Silymarin restored the activity of this enzyme only at a concentration of 30 µg/mL when compared to pre-incubated with Fe²⁺ ($p < 0.05$; Fig. 4B). Additionally, the reduction in catalase activity was not observed when the samples were incubated with different concentration of silymarin but without pro-oxidants (data not shown).

3.5. Effects of silymarin on SNP and Fe²⁺-induced thiol oxidation

Regarding the effect of silymarin on the oxidation of thiol groups, the results demonstrated that pre-incubation with both pro-oxidants SNP or Fe²⁺ decreased the levels of thiol groups (protein and non-protein) compared to control. Silymarin protected thiol groups from oxidation caused by SNP at concentrations of 30–300 µg/mL ($p < 0.05$; Fig. 5A and C). When the oxidation of thiol groups was caused by Fe²⁺, silymarin exhibited a significant effect only at concentrations of 100–300 µg/mL ($p < 0.05$; Fig. 5B and D). However, silymarin per se did not cause any significant effect on protein and non-protein thiol groups (data not shown).

3.6. Effects of silymarin on Na⁺/K⁺-ATPase activity

It was also evaluated the effects of silymarin on Na⁺/K⁺-ATPase of rat brain homogenates. Silymarin at concentrations of 30–300 µg/mL significantly activates the enzyme ($p < 0.05$; Fig. 6).

3.7. Effects of silymarin on MAO activity

Silymarin inhibited both MAO isoforms. However, the inhibitory effect on MAO-A occurred only at a concentration of 300 µg/mL while MAO-B was inhibited from 30 µg/mL in concentration-dependent manner (Fig. 7A and B).

Subsequently, kinetic experiments for isoforms MAO activity were carried out using different concentrations of substrate. Silymarin did not alter the K_m value (27.0 ± 4.34 µM) for MAO-A and (12.47 ± 2.09 µM) for MAO-B compared to K_m values obtained in the absence of silymarin (17.02 ± 2.50 µM, MAO-A; 11.56 ± 1.27 µM, MAO-B) (Fig. 7C and D). However, it caused

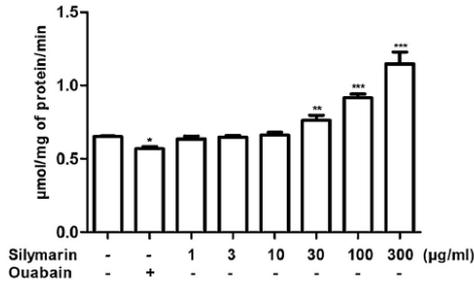


Fig. 6. Effect of Silymarin on Na⁺/K⁺-ATPase activity in rat brain. Results are expressed as mean ± SEM for three to four independent experiments performed in duplicate. One way ANOVA followed by Dunnett's test. *, **, ***Significant difference compared with control.

a decrease in the V_{max} value (0.41 ± 0.023 nmol/min/mg protein) for MAO-A and (0.54 ± 0.025 nmol/min/mg protein) for MAO-B compared to V_{max} values obtained in the absence of silymarin (0.56 ± 0.024 nmol/min/mg protein, MAO-A; (0.98 ± 0.028 nmol/min/mg protein) MAO-B, respectively, (Fig. 7C and D).

4. Discussion

Our results demonstrated that silymarin has antioxidant activity *in vitro*. Furthermore, silymarin differently alters the activity of two enzymes, by increasing the Na⁺/K⁺-ATPase activity and decreasing MAO activity *in vitro*.

It is recognized that cellular oxidative metabolism produces ROS which may cause lipid peroxidation and cell damage (Halliwell, 2011). In this context, the central nervous system is particularly susceptible to ROS because its high oxygen consumption and

relative low quantity in antioxidant defense (Halliwell et al., 1992; Sultana and Butterfield, 2004). By the other hand, natural products containing flavonoids, tannins, polyphenols, and other classes of secondary metabolites, have the ability to protect against oxidative stress (Kren and Walterová, 2005; Trouillas et al., 2008) being suggested as important pharmacological agents to counteract brain oxidative process which are present in neurodegenerative diseases (Rasool et al., 2014). Therefore, firstly we investigated if silymarin could be antioxidant in different *in vitro* protocols as well as to confirm the presence of its major component silibinin. Silibinin (silybin) is a natural occurring flavolignan isolated from the fruits of *S. marianum* which possess two stereoisomers, A and B. The structural difference of both stereoisomers confers to them different pharmacological properties (Zholobenko and Modriansky, 2014). As an example, silibinin B (but not A) is able to activate estrogen receptors while both isomers act as iron chelating (Borsari et al., 2001). As it is described in the literature, the major component present in silymarin was silibinin. Furthermore, silymarin presented antioxidant capacity being 250 µg/mL of Silymarin equivalent to 25 µg/mL of ascorbic acid. The stable free radical DPPH is widely used for quickly assessing the ability of antioxidants to scavenge it (Brand Williams et al., 1995). Silymarin presented a scavenger effect of DPPH radical with an IC_{50} of 92.36 µg/mL. Literature suggests that species derived from *S. marianum* have ability to scavenge free radicals, and also to promote an increment of glutathione, ascorbic acid (Valenzuela et al., 1989) and superoxide dismutase activity (Múzes et al., 1991) as well as to reduce MDA levels *in vivo* models (Nencine et al., 2007). Here we used two pro-oxidant agents, Fe²⁺ and SNP, to evaluate the efficacious of silymarin *in vitro*. SNP causes cytotoxicity *via* the release of cyanide and/or nitric oxide (Bates et al., 1991; Chen et al., 1991; Dawson et al., 1991; Rauhala et al., 1998) and have been suggested to play a role in brain diseases as Alzheimer's, and Parkinson's diseases (Bolanos and Almeida, 1999; Castill et al., 2000; Prast and Philippou, 2001; Weisinger, 2001). Indeed, SNP is a chemical inducer of lipid

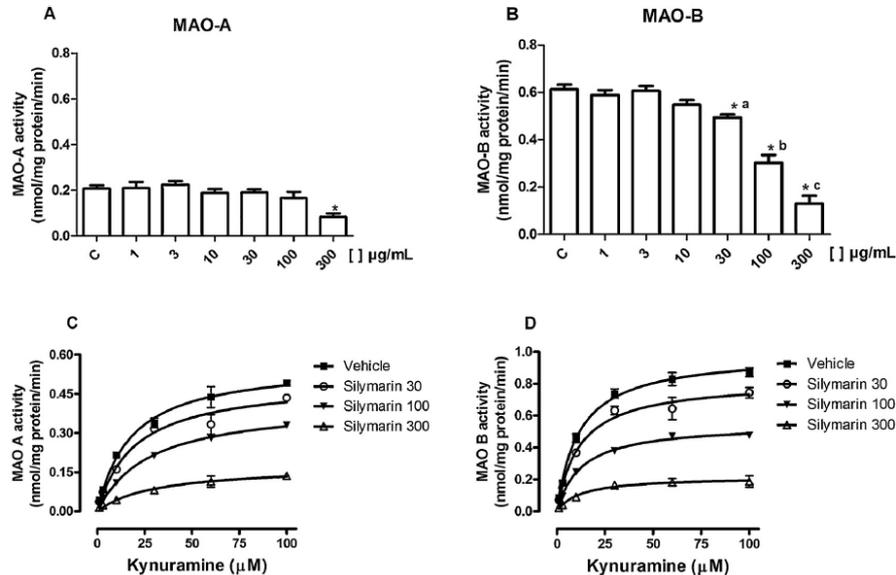


Fig. 7. Inhibitory potential of silymarin *in vitro* (A) MAO-A and (B) MAO-B activities in the mitochondrial fraction of rat brain. Substrate concentration curves for *in vitro* (C) MAO-A and (D) MAO-B activity in the absence or presence of silymarin (30, 100 or 300 µg/mL) in the mitochondrial fraction of rat brain. Values are means ± SEM of three experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Tukey's test. *Significant differences from control. ^{a,b,c}Significant differences among the concentrations

peroxidation (Wagner et al., 2006), since it rapidly releases NO* in tissue preparations (Bates et al., 1991). This radical easily produces peroxynitrite (ONOO⁻) and superoxide anion radical (O₂^{•-}), thus, leading to lipid peroxidation and production of additional free radicals (Beckman et al., 1990) which could also decrease the activity of antioxidant enzymes as example catalase. By the other hand, free iron can induce neurotoxicity (Bostanci and Bagirici, 2008) via stimulation of Fenton reaction (Fraga and Oteiza, 2002) with its levels increased in some degenerative diseases (Aisen et al., 1999; Qian et al., 1997). Furthermore, after the release of NO, SNP or [NO-Fe-(CN)₅]²⁻ is converted to iron containing [(CN)₅-Fe]³⁻ and [(CN)₄-Fe]²⁻ species (Loiacono and Beart, 1992) and the iron moiety may react with SNP which could also lead to formation of highly reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals via the Fenton reaction (Graf et al., 1984). Accordingly, it is worth noting that silymarin also demonstrated its efficacy in to reduce lipid peroxidation induced by pro-oxidant Fe²⁺ and SNP and avoid the loss of catalase activity caused by the pro-oxidant Fe²⁺ at a concentration of 30 µg/mL. Furthermore, the present study showed that silymarin protected protein and non-protein thiol groups from oxidation caused by Fe²⁺ and SNP. These results reinforce the *in vitro* studies to predict the activity of natural compounds *in vivo* since we showed similar results to those *in vivo* studies. An *in vitro* study using cell culture also demonstrated that in low concentrations of silymarin, catalase activity was restored after oxidative insult by manganese (Chtourou et al., 2011). A possible explanation is that in the concentration of 30 µg/mL of silymarin the antioxidant effect is only able to avoid the effects of pro-oxidants. By the other hand, at 100 µg/mL, the amount of silymarin also interacts with the enzyme avoiding the recovery of its activity. However, we think this interaction in not directly in thiol groups since silymarin *per se* had not effects neither on catalase nor thiol groups. Corroborating our data, silymarin *per se* did not modify thiol content and catalase activity neither *in vitro* (Chtourou et al., 2011) nor *in vivo* studies (Muthumani and Prabu, 2014). Furthermore, we demonstrated the concentrations of silymarin needed to reduce TBARS levels are lower than on thiol groups suggesting the lipophilic characteristics of the compounds (mainly silibinin) contribute to better antioxidant effects on lipid peroxidation. These data also reinforce that besides silymarin (specially the component silibinin) has iron chelating properties (Borsari et al., 2001; Hutchinson et al., 2010) this is not the only one mechanism responsible for its effects. Accordingly, literature has proposed that silymarin acts breaking the free radical chain reaction (Weber et al., 2006) and chelating metal ions (Borsari et al., 2001). In addition to antioxidant properties, molecules naturally presented in medicinal plants have presented specific activities in important target involved in brain disease (Bandaruk et al., 2012; Pereira et al., 2014). In this context, we investigated the effect of silymarin on two enzymes, Na⁺/K⁺-ATPase and MAO activity. Na⁺/K⁺-ATPase is a membrane protein responsible for the active transport of Na⁺ and K⁺ ions across the plasma membranes of most higher eukaryotes using the energy derived from the hydrolysis of the ATP (Kaplan, 2002). It is recognized that the inactivation of Na⁺/K⁺-ATPase leads to a partial depolarization of cell membrane which causes an excess of calcium influx into neuronal cells and, consequently, excitotoxicity (Beal et al., 1993). Considering the high enzyme concentration Na⁺/K⁺-ATPase in brain cellular membranes and the large consumption of the ATP generated, this plays a crucial role in neuronal excitability (Erecinska and Silver, 1994), where as a decrease in its activity maintains relationship with psychiatric disorders (Wood et al., 1991). Silymarin increased the activity of Na⁺/K⁺-ATPase *in vitro* from 30 µg/mL suggesting this enzyme could be an important target to neuroprotective effects of silymarin. As Na⁺/K⁺-ATPase depends on the integrity of cell membrane to its function the effect of silymarin could be due to its membrane-stabilizing properties which in turn might be related

to the blocking of lipid peroxidation in cell membranes (Basiglio et al., 2009).

Another enzyme that seems to play important roles in several psychiatric and neurological disorders is MAO which catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines (Youdim and Bakhle, 2006). The inhibition of this enzyme decreases the formation of acidic metabolites and hydrogen peroxide is increased which is related to neuroprotective effects (Youdim and Bakhle, 2006). Silymarin inhibited both isoforms of MAO with a higher potency to inhibit MAO-B. Furthermore, we also evaluated the kinetic profile of MAO inhibition by silymarin. Silymarin did not alter the *K_m* value of both MAO isoforms. However, it caused a decrease in the *V_{max}* value for MAO-A and MAO-B compared to *V_{max}* values obtained in the absence of silymarin suggesting this interaction is not on active site of the enzyme due to noncompetitive nature inhibition.

5. Conclusion

In conclusion, Silymarin showed antioxidant activity *in vitro*, preventing lipid peroxidation in brain tissue and avoiding the decrease of the antioxidant defense system. Furthermore, we showed for the first time that silymarin alters the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and MAO. The results indicate that the antioxidant activity of silymarin is not probably the only one mechanism related to its neuroprotective effect.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Financial support by FAPERGS (2080-2551/13-5-PqG-001/2013) and CNPq (475210/2013-1) is gratefully acknowledged. A.B., A.A.B., C.M.F., D.R.O., L.F.S. and L.R.P. are recipient of CAPES fellowship. C.P.B. is recipient of PIBIC/CNPq fellowship. R.F. and M.L.A. are recipient of CNPq fellowship.

References

- Abbas, S.R., Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Boligon, A.A., Athayde, M.L., 2014. Phenolic profile: antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Food Chem. 147, 10–16.
- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F., 2010. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother. Res. 24, 1423–1432.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105, 121–125.
- Aisen, P., Wessling-Resnick, M., Leibold, E.A., 1999. Iron metabolism. Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 200–206.
- Almaliti, J., Nada, S.E., Carter, B., Shah, Z.A., Tillekeratne, L.M., 2013. Natural products inspired synthesis of neuroprotective agents against H₂O₂-induced cell death. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 1232–1237.
- Bandaruk, Y., Mukai, R., Kawamura, T., Nemoto, H., Terao, J., 2012. Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. J. Agric. Food Chem. 60, 10270–10277.
- Basiglio, C.L., Sanchez Pozzi, E.J., Mottino, A.D., Roma, M.G., 2009. Differential effects of silymarin and its active component SB on plasma membrane stability and hepatocellularlysis. Chem.–Biol. Interact. 179, 297–303.
- Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R., Harrison, D.G., 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Biochem. Pharmacol. 42, 157–165.
- Beal, M.F., Hyman, B.T., Koroshetz, W., 1993. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases. Trends Neurosci. 16, 125–131.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 1620–1624.
- Boigk, G., Stroedter, L., Herbst, H., Waldschmidt, J., Riecken, E.O., Schuppan, D., 1997. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. Hepatology 26, 643–649.
- Bolanos, J., Almeida, A., 1999. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. Biochim. Biophys. Acta 1411, 415–436.

- Boligon, A.A., Kubiça, T.F., Mario, D.N., Brum, T.F., Piana, M., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Santos, R.C.V., Alves, C.F.S., Athayde, M.L., 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2229–2239.
- Borah, A., Paul, R., Choudhury, S., Choudhury, A., Bhuyan, B., Talukdar, A., Choudhury, M.D., Mohanakumar, K.P., 2013. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 847–853.
- Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi, S., et al., 2001. Silybin: a new iron-chelating agent. *J. Inorg. Biochem.* 85, 123–129.
- Bostanci, M.O., Bagirici, F., 2008. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. *Brain Res. Bull.* 76, 57–62.
- Busanello, A., Barbosa, N.B., Peroza, L.R., Farias, L.E., Burger, M.E., Barreto, K.P., Fachinnetto, R., 2011. Resveratrol protects against a model of vacuolar chewing movements induced by reserpine in mice. *Behav. Pharmacol.* 22, 71–75.
- Busanello, A., Peroza, L.R., Wagner, C., Sudati, J.H., Pereira, R.P., Prestes, A.S., Rocha, J.B., Fachinnetto, R., Barbosa, N.B., 2012. Resveratrol reduces vacuolar chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 307–310.
- Brand Williams, W., Cuvelier, M.C., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28, 25–30.
- Castill, J., Rama, R., Davalos, A., 2000. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 31, 852–857.
- Chen, J., Chang, B., Williams, M., Murad, F., 1991. Sodium nitroprusside degenerates cultured rat striatal neurons. *NeuroReport* 2, 121–123.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 153, 1161–1168.
- Chtourou, Y., Trabelsi, K., Fetoui, H., Mkannez, G., Kallel, H., Zeghal, N., 2011. Manganese induces oxidative stress, redox state imbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin. *Neurochem. Res.* 36, 1546–1557.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6368–6371.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37–71.
- Figtree, G.A., Keyvan Karimi, G., Liu, C.C., Rasmussen, H.H., 2012. Oxidative regulation of the Na⁺-K⁺ pump in the cardiovascular system. *Free Radical Biol. Med.* 53, 2263–2268.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400.
- Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2002. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 80, 23–32.
- Galhardi, F., Mesquita, K., Monserrat, J.M., Barros, D.M., 2009. Effect of Silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2655–2660.
- Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W., 1984. Iron catalyzed hydroxyl radical formation: stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259, 3620–3624.
- Halliwel, B., 2011. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598–620.
- Hutchinson, C., Bomford, A., Geissler, C.A., 2010. The iron-chelating potential of silybin in patients with hereditary haemochromatosis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64, 1239–1241.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlsh, S.J., 2003. Structure and mechanism of Na⁺-K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817–849.
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511–535.
- Katiyar, S.K., Korman, N.J., Mukhtar, H., Agarwal, R., 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 556–566.
- Kren, V., Walterová, D., 2005. Silybin and silymarin—new effects and applications. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czech Repub.* 149, 29–41.
- Kurella, E.G., Tyulina, O.V., Boldyrev, A.A., 1999. Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19, 133–140.
- Kvasnicka, F., Biba, B., Sevcik, R., Voldrich, M., Krátká, J., 2003. Analysis of the active components of silymarin. *J. Chromatogr. A* 990, 239–245.
- Loiacono, R.E., Beart, P.M., 1992. Hippocampal-lesions induced by microinjection of the nitric-oxide on/nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.* 216, 331–333.
- Lowry, O.H., 1951. Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, P., Mamiya, T., Lu, L.L., Mouri, A., Zou, L., Nagai, T., Hiramatsu, M., Ikejima, T., Nabeshima, T., 2009. Silybinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1270–1277.
- Miadonna, A., Tedeschi, A., Leggieri, E., Lorini, M., Froidi, M., Zanussi, C., 1987. Effects of silybin on histamine release from human basophil leucocytes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24, 747–752.
- Muthumani, M., Prabu, S.M., 2014. Silybinin potentially attenuates arsenic-induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Cardiovasc. Toxicol.* 14, 83–97.
- Müzes, G., Deák, G., Láng, I., Nékám, K., Gergely, P., Fehér, J., 1991. Effect of the bioflavonoid silymarin on the *in vitro* activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. *Acta Physiol. Hung.* 78, 3–9.
- Nencine, C., Giorgi, G., Micheli, L., 2007. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine* 14, 129–135.
- Ohkawa, H., Oishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Ou, X.M., Chen, K., Shih, J.C., 2006. Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10923–10928.
- Pepping, J., 1999. Milk thistle: *Silybum marianum*. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 56, 1195–1197.
- Pereira, R.P., Boligon, A.A., Appel, A.S., Fachinnetto, R., Ceron, C.S., Tanus-Santos, J.E., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T., 2014. Chemical composition: antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. *Ind. Crops Prod.* 53, 34–45.
- Peroza, L.R., Busanello, A., Leal, C.Q., Röpke, J., Boligon, A.A., Meinerz, D., Libardoni, M., Athayde, M.L., Fachinnetto, R., 2013. Bauhinia forficata prevents vacuolar chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential *in vitro*. *Neurochem. Res.* 38, 789–796.
- Prast, H., Philippou, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51–68.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
- Qian, Z.M., Wang, Q., Pu, Y., 1997. Brain iron and neurological disorders. *Chin. Med. J.* 110, 455–458.
- Rasool, M., Malik, A., Qureshi, M.S., Manan, A., Pushparaj, P.N., Asif, M., Qazi, M.H., Qazi, A.M., Kamal, M.A., Gan, S.H., Sheikh, I.A., 2014. Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014 (979730, accepted manuscript).
- Rauhala, P., Khalidil, A., Mohanakumar, K.P., Chiuhe, C.C., 1998. Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radical Biol. Med.* 24, 1065–1073.
- Raza, S.S., Khan, M.M., Ashfaq, M., Ahmad, A., Khuwaja, G., Khan, A., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2011. Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: a behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. *J. Neurol. Sci.* 309, 45–54.
- Reckziegel, P., Peroza, L.R., Schaffer, L.F., Ferrari, M.C., Freitas, C.M., Bürger, M.E., Fachinnetto, R., 2013. Gallic acid decreases vacuolar chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 104, 132–137.
- Saller, R., Meier, R., Brignoli, R., 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 61, 2035–2063.
- Santos, J.R., Gois, A.M., Mendonça, D.M., Freire, M.A., 2014. Nutritional status, oxidative stress and dementia: the role of selenium in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 6, 206.
- Schaffer, L.F., Peroza, L.R., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Alves, S.H., Fachinnetto, R., Wagner, C., 2013. *Harpagophytum procumbens* prevents oxidative stress and loss of cell viability *in vitro*. *Neurochem. Res.* 38, 2256–2267.
- Schapira, A.H., Olanow, C.W., Greenamyre, J.T., Bezdard, E., 2014. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 384, 545–555.
- Singhal, N.K., Srivastava, G., Patel, D.K., Jain, S.K., Singh, M.P., 2011. Melatonin or Silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. *J. Pineal Res.* 50, 97–109.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Sultana, R., Butterfield, D.A., 2004. Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. *Neurochem. Res.* 29, 2215–2220.
- Trouillas, P., Marsal, P., Svobodova, A., Vostálová, J., Gazoák, R., Hrbáč, J., Sedmera, P., Kren, V., Lazzaroni, R., Duroux, J., Walterová, D., 2008. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydroisilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* 112, 1054–1063.
- Valenzuela, A., Aspíllaga, M., Vial, S., Gerra, S., 1989. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Plant Med.* 55, 420–422.
- Villarinho, J.G., Fachinnetto, R., Pinheiro, F.V., Sant'Anna, G.S., Machado, P., Dombrowski, P.A., da Cunha, C., Cabrini, D.A., Martins, M.A.P., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Rubin, M.A., Ferreira, J., 2012. Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 31–39.
- Wagner, C., Fachinnetto, R., Dalla Corte, C.L., Brito, V.B., Severo, D., Dias, G.O.D., Morel, A.F., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2006. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Res.* 1107, 192–198.
- Wang, M.J., Lin, W.W., Chen, H.L., Chang, Y.H., Ou, H.C., Kuo, J.S., Hong, J.S., Jeng, K.C.G., 2002. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2103–2112.
- Weber, K.C., Honório, K.M., Bruni, A.T., da Silva, A.B., 2006. The use of classification methods for modeling the antioxidant activity of flavonoid compounds. *J. Mol. Model.* 12, 915–920.
- Weisinger, H., 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64, 365–391.

- Wood, A.J., Smith, C.E., Clarke, E.E., Cowen, P.J., Aronson, J.K., Grahame-Smith, D.G., 1991. Altered *in vitro* adaptive responses of lymphocyte Na, K-ATPase in patients with manic depressive psychosis. *J. Affect. Disord.* 21, 199–206.
- Youdim, M.B., Bakhle, Y.S., 2006. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.* 147, 287–296.
- Zhang, L.N., Sun, Y.J., Pan, S., Li, J.X., Qu, Y.E., YE, Li, Y., Wang, Y.L., Gao, Z.B., 2013. Na⁺-K⁺-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27, 96–103.
- Zholobenko, A., Modriansky, M., 2014. Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia* 97, 122–132.

3.2 Artigo 2

***In vitro* antimicrobial and modulatory activity of the natural products Silymarin and
Silibinin**

Dayanne Rakelly de Oliveira, Saulo Relison Tintino, Maria Flaviana Bezerra Morais Braga,
Aline Augusti Boligon, Margareth Linde Athayde, Henrique Douglas Melo Coutinho, Irwin
Rose Alencar de Menezes, Roselei Fachinetto *

Periódico: Biomed Research International, 2015, 7 páginas.

Research Article

***In Vitro* Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin**

Dayanne Rakelly de Oliveira,¹ Saulo Relison Tintino,² Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga,² Aline Augusti Boligon,³ Margareth Linde Athayde,³ Henrique Douglas Melo Coutinho,² Irwin Rose Alencar de Menezes,⁴ and Roselei Fachineto^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-700 Santa Maria, RS, Brazil

²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri (URCA), 63100-000 Crato, CE, Brazil

³Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-700 Santa Maria, RS, Brazil

⁴Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, 63100-000 Crato, CE, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-700 Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Henrique Douglas Melo Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 26 September 2014; Revised 12 February 2015; Accepted 15 February 2015

Academic Editor: Glen Jickling

Copyright © 2015 Dayanne Rakelly de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Silymarin is a standardized extract from the dried seeds of the milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) clinically used as an antiepatotoxic agent. The aim of this study was to investigate the antibacterial and antifungal activity of silymarin and its major constituent (silibinin) against different microbial strains and their modulatory effect on drugs utilized in clinical practice. Silymarin demonstrated antimicrobial activity of little significance against the bacterial strains tested, with MIC (minimum inhibitory concentration) values of 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Meanwhile, silibinin showed significant activity against *Escherichia coli* with a MIC of 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results for the antifungal activity of silymarin and silibinin demonstrated a MIC of 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all strains. Silymarin and silibinin appear to have promising potential, showing synergistic properties when combined with antibacterial drugs, which should prompt further studies along this line.

1. Introduction

Microbial infections have become one of the principal problems of public health in the world, affecting all countries, developing or developed. It can be related to the process of natural selection in bacterial development or the natural consequence of the adaptation of bacteria to exposure to antibiotics in the course of the indiscriminate use of antibiotics in humans and animals. Various cases related to resistance have been reported, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1], penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* (PNSSP), vancomycin-resistant

enterococci (VRE), extended spectrum beta-lactamase-(ESBL-) producing Enterobacteriaceae, and *Candida sp* resistant to imidazoles.

Staphylococcus aureus is a common cause of cutaneous and soft tissue infections, as well as invasive illness, such as bacteremia, septic arthritis, osteomyelitis, and necrotizing pneumonia [2, 3]. *Escherichia coli* is a Gram-negative bacillus that causes infections, especially neonatal, such as meningitis and septicemia, and even diarrheal diseases, in the whole world, particularly affecting children up to 5 years old. *E. coli* is typical of the intestinal flora and commensal of the vaginal flora [4, 5]. Also, *Pseudomonas aeruginosa* has often

been associated with occurrence of hospital infections and antibiotic resistance events [6, 7].

Microbial resistance is thus problematic for public health, especially coupled to virulence potential of these multiresistant pathogens. Accordingly, we should emphasize the relevance of the discovery of new drugs with antimicrobial capacity and/or showing synergism with drugs already employed in clinical practice [8]. Thus, in the last years, there has been increased use of plants and their derivatives as an alternative modality in the treatment of various diseases, including infections caused by microorganisms [9].

Infections by yeasts of *Candida* occur on cutaneous and mucosal surfaces, but, in some cases, they become severe by causing systemic infection, especially in immunocompromised patients. Moreover, therapeutic options are still limited, particularly in treating resistant pathogens [10]. Additionally, the indiscriminate use of broad spectrum antibiotics has contributed to the development of fungal infections [11].

Silymarin is a standardized extract from the dried seeds of the milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), family Asteraceae [12]. Silymarin contains approximately 70–80% flavonolignans and 20–30% nonidentified oxidized polyphenolic compounds fraction. The mixture of flavonolignans consists mainly of silybin (silibinin), the major bioactive component of the extract, and isomeric isosilybin, silychristin, and silydianin and two flavonoids (taxifolin and quercetin) [13, 14]. Silibinin currently is recommended for use in alcoholic liver disease. Ethanol induces free radical formation through multiple pathways, resulting in steatohepatitis and cirrhosis with chronic use [15, 16].

Silymarin has clinical use as antihepatotoxic agent [17], has anti-inflammatory properties [18], and is antitumor [19], antifibrotic, and cytoprotective [20]. Studies have reported the synergistic activity of silibinin when combined with ampicillin and gentamicin against bacteria that attack the oral cavity [21]. However, there are few works that have evaluated the antimicrobial capacity of silymarin and silibinin, demonstrating the need to extend the study of their therapeutic use in this regard.

The objective of this work was to investigate silymarin and its major component, silibinin, for possible antimicrobial effects and drug-modifying activity when combined with antibacterial and antifungal drugs commonly used in the clinic and also to compare the activity of the two agents.

2. Materials and Methods

2.1. Quantification of Compounds by HPLC-DAD. Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was 15% of B for 10 min and was changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20%, and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 80 min, respectively, following the method described by Boligon et al. [22] with slight modifications. Silymarin extract was analyzed at a concentration of 2.4 mg/mL; the identification of silybin (A and B), gallic

acid, and caffeic acid was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.6 mL/min, the injection volume was 40 μ L, and the wavelength was 254 nm for gallic acid, 280 nm for silybin (A and B), and 327 nm for caffeic acid. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. A stock solution of standards references was prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030–0.250 mg/mL. The chromatography peaks were confirmed by comparing DAD (Diode Array Detector) retention time with those of reference standard and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid is $Y = 11945 + 1268.4$ ($r = 0.9997$), for caffeic acid is $Y = 13407 + 1361.8$ ($r = 0.9992$), for silybin A is $Y = 12683 + 1185.9$ ($r = 0.9999$), and for silybin B is $Y = 13045x + 1376.1$ ($r = 0.9995$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.2. Preparation of Stock Solution and Test Solutions. Stock solutions of silymarin and silibinin were prepared at a concentration of 10 mg/mL in 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). Using this concentration, the compounds were diluted in 1 mL of sterile distilled water to obtain a concentration of 1024 μ g/mL (test solution).

2.3. Fungal and Bacterial Strains. The minimal inhibitory concentration (MIC) of silymarin and silibinin was determined using the bacterial strains *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* 9027 and the fungal strains *Candida albicans* 62, *C. krusei* 02, and *C. tropicalis* 20. All strains were obtained from the Clinical Mycology Laboratory of the Federal University of Paraíba. In the antibiotic-modifying assays, we used the multiresistant bacterial strains from the clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* 03, *Escherichia coli* 06, and *Staphylococcus aureus* 10 and the standard yeasts *Candida albicans*, INCQS 40006, *C. krusei*, INCQS 40095, and *C. tropicalis*, INCQS 400042.

We utilized the following culture media for bacteria: heart infusion agar (HIA; Difco Laboratories Ltda.) and brain heart infusion broth (BHI at 10% as indicated by the manufacturer; Acumedia Manufacturers Inc.). Sabouraud dextrose broth was used for fungi. All culture media were prepared following the manufacturer's instructions. Fungal and bacterial cultures were maintained at 4°C in HIA. Before the tests, the strains were passaged using the above media and incubated at 37°C for 24 h. The plated strains were inoculated into BHI broth and again incubated at 37°C for 24 h. A small aliquot of the cultivated inoculum was removed and diluted in sterile saline to give turbidity equivalent to 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 10^5 CFU/mL [23]. The resistance profile and origin of the bacterial strains are described in Table 1.

TABLE 1: Origin of bacterial strains and their resistance to antibiotics.

Bacteria	Origin	Resistance profile
<i>Escherichia coli</i> 06	Surgical wound	Aztreonam, Amoxicillin, Ampicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefadroxil, Cefaclor, Cephalothin, Ceftazidime, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Imipenem, Kanamycin, Sulphametrim, Tetracycline, and Tobramycin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Urine culture	Ceftazidime, Imipenem, Ciprofloxacin, Piperacillin-Tazobactam, Levofloxacin, Meropenem, and Ampicillin
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Surgical wound	Oxacillin, Gentamicin, Tobramycin, Ampicillin, Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Butirosin, Sisomicin, and Netilmicin

2.4. Drugs. The antibacterial drugs utilized were amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, and imipenem/cilastatin sodium, and the antifungals employed were mebendazole and nystatin (Sigma Co., St. Louis, USA), at an initial concentration of 2500 µg/mL and 1024 µg/mL, respectively. All drugs were dissolved in sterile water. Silymarin powder was obtained commercially from DEG importation (Santa Maria, Brazil). Silibinin was obtained from Sigma Co. The reagent sodium resazurin was utilized as the indicator of bacterial growth; it was also obtained from Sigma Co. and stored at 4°C away from light. In reading the assay, a color change from blue to pink due to the reduction of resazurin indicated bacterial growth [24].

2.5. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC). Antimicrobial activity of the assayed products was determined by the microdilution assay. A volume of 100 µL of 10% BHI medium was added to each well of a 96-well microplate and 100 µL of the test product was used to do a twofold serial dilution giving concentrations of 512 to 8 µg/mL. Next, 100 µL of the bacterial or yeast suspension was added to all wells except the negative control or blank. The negative control contained 100 µL of 10% BHI medium and 100 µL of test product. Meanwhile, the positive control contained the bacterial or yeast suspension and 10% BHI. The plates were placed in an incubator for 24 h at 37°C [25]. Bacterial growth was determined utilizing resazurin, while fungal growth was evaluated according to turbidity. The assays were done in triplicate. MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed in accordance with NCCLS [23].

2.6. Test for Antibiotic-Modifying Activity. Silymarin and silibinin were tested for possible antibiotic-modifying activity by their combination with the antibacterial and antifungal drugs listed above, according to the method proposed by Coutinho et al. [26], where the test products were used at a subinhibitory concentration (MIC/8).

2.7. Statistical Analysis. Each experiment was performed six times and the results were normalized by calculation of geometric mean values. Error deviation and standard deviation of the geometric mean were revealed. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.02. Differences between treatment with antibiotics in the absence and in the presence of the products were examined

TABLE 2: Composition of *Silymarin* extract.

Compounds	<i>Silymarin</i> mg/g	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
Gallic acid	2.16 ± 0.01 ^a	0.009	0.029
Caffeic acid	5.09 ± 0.03 ^b	0.032	0.105
Silybin A	12.75 ± 0.01 ^c	0.011	0.034
Silybin B	15.93 ± 0.03 ^d	0.027	0.89

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey's test at $P < 0.05$.

using two-way analysis of variance (ANOVA). The differences mentioned above were analyzed by Bonferroni posttest and they were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. HPLC Analysis. HPLC fingerprinting of silymarin extract revealed the presence of gallic acid ($t_R = 10.19$ min; peak 1), caffeic acid ($t_R = 24.97$ min; peak 2), silybin A ($t_R = 42.17$ min; peak 3), and silybin B ($t_R = 45.89$ min; peak 4). Calibration curve for gallic acid is $Y = 11945 + 1268.4$ ($r = 0.9997$), for caffeic acid is $Y = 13407 + 1361.8$ ($r = 0.9992$), for silybin A is $Y = 12683 + 1185.9$ ($r = 0.9999$), and for silybin B is $Y = 13045x + 1376.1$ ($r = 0.9995$) (Table 2; Figure 1).

3.2. Antibacterial Activity and Modulation of Antibiotic Activity by Silymarin Extract and Silibinin. Silymarin demonstrated antimicrobial activity that was clinically irrelevant, with MIC values of 512 µg/mL. The results demonstrating the modulatory antibiotic activity of silymarin and silibinin are demonstrated in Figures 2–4 and the silymarin at a concentration of 64 µg/mL was combined with the antibiotics. Silibinin showed a MIC of 1024 µg/mL and was thus clinically irrelevant for the strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, so a concentration of 128 µg/mL was used in drug-modifying assays. However, for *Escherichia coli* ATCC 25922, the MIC was 64 µg/mL, and thus, a concentration of 8 µg/mL was used in drug-modifying assays.

Silymarin and silibinin demonstrated antifungal activity with MIC value of 1024 µg/mL for all strains, and thus, a concentration of 128 µg/mL was used for both products to evaluate antibiotic-modifying activity.

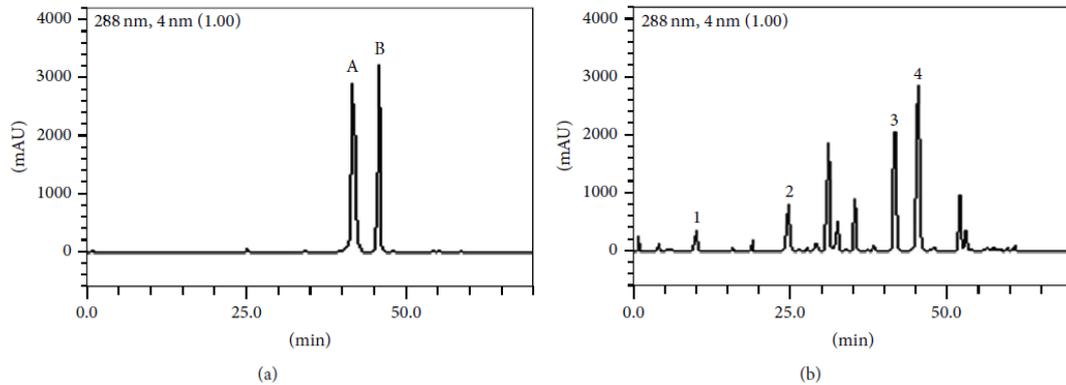


FIGURE 1: Representative high performance liquid chromatography profile of Silymarin, detection UV was at 288 nm. Gallic acid (peak 1), caffeic acid (peak 2), silybin A (peak 3), and silybin B (peak 4) ((a) and (b)).

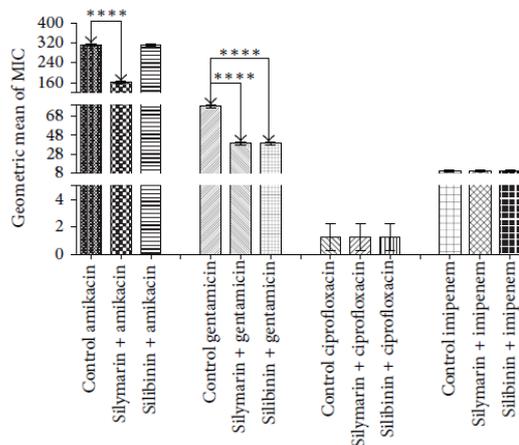


FIGURE 2: MIC ($\mu\text{g/mL}$) of the antibiotics in the absence and presence of silymarin and silibinin at subinhibitory concentrations for *E. coli* strain EC06.

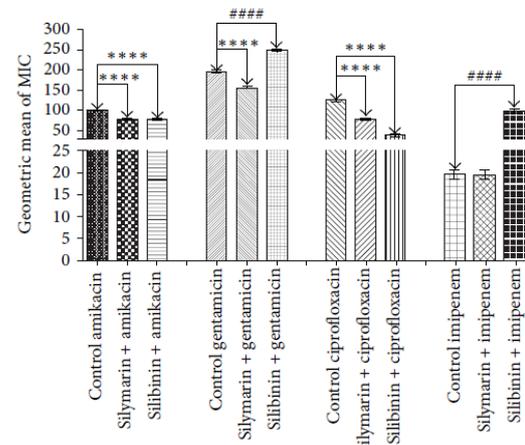


FIGURE 3: MIC ($\mu\text{g/mL}$) of the antibiotics in the absence and presence of silymarin and silibinin at subinhibitory concentrations for *P. aeruginosa* strain PA03.

Silymarin demonstrated significant synergistic activity in modulating the effect of aminoglycosides against *E. coli* ($P < 0.001$), reducing the MIC from 312.5 to 156.25 $\mu\text{g/mL}$ for amikacin and from 78.125 to 39.06 $\mu\text{g/mL}$ for gentamicin. Silibinin showed similar synergism when combined with gentamicin ($P < 0.001$), lowering the MIC from 78.125 to 39.06 $\mu\text{g/mL}$ when compared to the control. Silymarin and silibinin showed significant synergism in the presence of the antibiotics amikacin with a reduction in MIC from 78.125 to 39.06 $\mu\text{g/mL}$ and ciprofloxacin with a reduction in MIC from 78.125 to 39.06 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$) against *P. aeruginosa* compared to the control. Silymarin also demonstrated a significant synergistic effect when combined with gentamicin lowering the MIC from 156.25 to 78.125 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$) in relation to the control.

It is important to mention that silibinin showed an antagonistic effect when combined with gentamicin and imipenem. But against *S. aureus*, silymarin and silibinin displayed substantial synergistic activity when combined with the antibiotics amikacin, reducing the MIC from 19.53 to 1.22 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$), gentamicin, lowering the MIC from 19.53 to 9.76 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$), and imipenem, reducing the MIC from 39.06 to 2.44 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$), compared to the control.

The results demonstrating the modulatory effect against antifungal drugs were demonstrated in Figures 5 and 6. The antifungal modulatory activity of the products tested indicated an antagonistic effect against *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*, when compared to nystatin and no significant effect in combination with mebendazole.

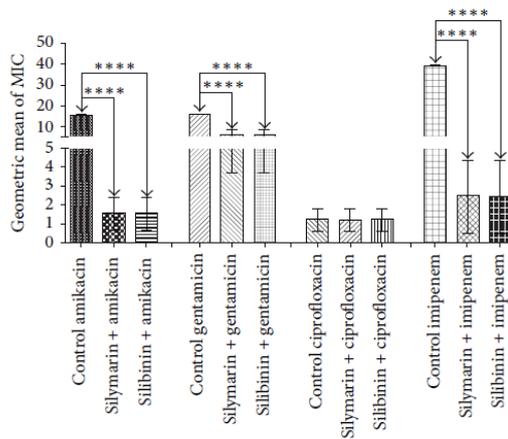


FIGURE 4: MIC ($\mu\text{g/mL}$) of the antibiotics in the absence and presence of silymarin and silibinin at subinhibitory concentrations for *S. aureus* strain SA10.

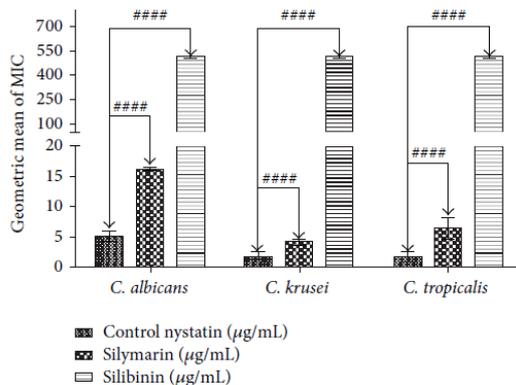


FIGURE 5: MIC ($\mu\text{g/mL}$) of nystatin in the absence and presence of silymarin and silibinin at subinhibitory concentrations for *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*.

4. Discussion

Infections caused by pathogens such as *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans* have a high prevalence, where they are responsible for the increase in worldwide morbimortality of infections [27]. Factors involved in this increase vary from insufficient supply of antimicrobials, especially in poorer countries, to occurrence of antibiotic resistance. Thus, in the last decades, there has been an increase in the popular use of plants and their derivatives for infections caused by microorganisms [28].

Various studies on the evaluation of the antimicrobial activity of natural products have been conducted with the aim of broadening the spectrum of antimicrobial therapy. However, it is important to mention that the microdilution

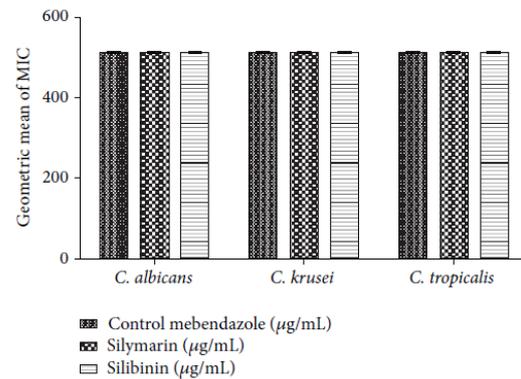


FIGURE 6: MIC ($\mu\text{g/mL}$) of the mebendazole in the absence and presence of silymarin and silibinin at subinhibitory concentrations for *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*.

method, employed in the present investigation, currently represents the technique most accepted for this bioassay [29].

Silybum marianum (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L. Asteraceae) (milk thistle) has been used for more than 2000 years to treat liver and gallbladder disorders, including hepatitis, cirrhosis, and jaundice, and to protect the liver against poisoning from chemical and environmental toxins [12]. Silymarin is an active component of this plant, a standardized extract obtained from the seeds of *S. marianum* containing approximately 70 to 80% of the silymarin flavonolignans and approximately 20 to 30% is chemically undefined fraction, comprising mostly polymeric and oxidized polyphenolics compounds [30]. Silibinin is a major bioactive component of silymarin [13].

The incidence of studies investigating the biological activities of silymarin and silibinin has increased, given the variety of important pharmacological effects associated with these compounds, together with the fact that the use of silymarin/silibinin is considered safe, where there have been few reports of adverse effects [31, 32]. Recent *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that silibinin has antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antiarthritic properties [31]. Also, silibinin has shown antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis* [33].

Findings have pointed to a synergistic drug-modifying effect when silymarin and silibinin were combined with antibiotics, especially aminoglycosides, against the different bacterial strains evaluated, where silibinin had an antagonistic effect when combined with imipenem and gentamicin against *P. aeruginosa*. Accordingly, phenolic compounds, for example, flavonoids and lignans, have demonstrated their therapeutic potential as antimicrobial agents, where they are considered responsible for this activity [34, 35]. The synergistic effect of flavonoids combined with commonly utilized antibiotics is well supported in the literature, emerging as an important complementary treatment modality in research [36].

It is believed, therefore, that phenolic compounds possess the capacity to form complexes with extracellular soluble proteins that bind to bacterial cell wall [37]. Studies have shown that many natural compounds alter the permeability of the cell membrane, favoring the penetration of antibiotics [38]. The interaction with bacterial enzymes can also be related to the synergistic mechanism of natural products with antibiotics [39], which can be obtained from an extract or from the combination of extracts, synthetic products, antibiotics, and other natural products [40, 41].

With respect to the antibacterial action of flavonoids, studies have demonstrated a significant inhibitory effect on DNA topoisomerase activity by the formation of complexes that alter enzyme binding [42]. In this perspective, the antibacterial activity of these compounds could also be related to the presence of hydroxyl phenolic groups that interfere with the bacterial synthetic processes by enzyme inhibition [43, 44].

Our results pointed to an antagonistic effect when silymarin and silibinin were combined with nystatin against the yeasts *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. This result was probably due to the cell structure of the fungi, mainly the chitin cell wall of these microorganisms, which apparently affects the action of antifungal agents and drug-modifying activity of natural products. However, new studies are needed to determine how this occurs. Considering the growing use of antifungal agents in cancer treatment and infectious diseases in general, these agents have contributed to the increase in drug resistance, leading to the need to discover new and alternative treatment modalities [45]. Thus, plant species rich in active metabolites such as flavonoids merit attention [46].

5. Conclusions

This work indicates the possibility of the usage of silymarin and silibinin as a source of new drugs as adjuvants in the antibiotic therapy against multidrug resistant bacteria (MDR), being a promising choice against the concerning problem of the antibiotic resistance.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq, CAPES, and FUNCAP for the funding of this work.

References

- [1] S. Gibbons, "Anti-staphylococcal plant natural products," *Natural Product Reports*, vol. 21, no. 2, pp. 263–277, 2004.
- [2] M. Otto, "Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Annual Review of Microbiology*, vol. 64, pp. 143–162, 2010.
- [3] P. Seymour and J. Golding, "Hospital-acquired and community-acquired MRSA: two distinct infections," *Emergency Medicine*, vol. 41, no. 10, pp. 36–41, 2009.
- [4] S. Watt, P. Lanotte, L. Mereghetti, M. Moulin-Schouleur, B. Picard, and R. Quentin, "*Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 5, pp. 1929–1935, 2003.
- [5] R. L. Vogt and L. Dippold, "Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002," *Public Health Reports*, vol. 120, no. 2, pp. 174–178, 2005.
- [6] C. van Delden and B. H. Iglewski, "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 4, no. 4, pp. 551–560, 1998.
- [7] E. J. Muñoz-Ellias and J. D. McKinney, "Bacterial persistence: strategies for survival," in *Immunology of Infectious Diseases*, S. H. E. Kaufmann, A. Sher, and R. Ahmed, Eds., pp. 331–355, ASM Press, Washington, DC, USA, 2002.
- [8] R. C. Moellering, "Novos desafios no campo das doenças infecciosas," in *Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Prática*, Euromédice, Edições Médicas, Oeiras, Portugal, 2000.
- [9] I. F. Silva Jr., V. C. Filho, S. A. Zacchino, J. C. D. S. Lima, and D. T. D. O. Martins, "Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 1, pp. 242–248, 2009.
- [10] Z. A. Kanafani and J. R. Perfect, "Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 46, no. 1, pp. 120–128, 2008.
- [11] R. S. Almeida, *Micologia*, Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, Brazil, 2008.
- [12] P. Morazzoni and E. Bombardelli, "*Silybum marianum* (*Carduus marianus*)," *Fitoterapia*, vol. 66, no. 1, pp. 3–42, 1995.
- [13] C. Loguercio and D. Festi, "Silybin and the liver: from basic research to clinical practice," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 17, no. 18, pp. 2288–2301, 2011.
- [14] H. Wagner, L. Hörhammer, and R. Münster, "On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.)," *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, vol. 18, no. 6, pp. 688–696, 1968.
- [15] C. Nencini, G. Giorgi, and L. Micheli, "Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain," *Phytomedicine*, vol. 14, no. 2–3, pp. 129–135, 2007.
- [16] A. Valenzuela and R. Guerra, "Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver," *FEBS Letters*, vol. 181, no. 2, pp. 291–294, 1985.
- [17] R. Saller, R. Meier, and R. Brignoli, "The use of silymarin in the treatment of liver diseases," *Drugs*, vol. 61, no. 14, pp. 2035–2063, 2001.
- [18] A. Miadonna, A. Tedeschi, E. Leggieri, M. Lorini, M. Frolidi, and C. Zanussi, "Effects of silybin on histamine release from human basophil leucocytes," *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 24, no. 6, pp. 747–752, 1987.
- [19] S. K. Katiyar, N. J. Korman, H. Mukhtar, and R. Agarwal, "Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 8, pp. 556–566, 1997.
- [20] G. Boigk, L. Stroedter, H. Herbst, J. Waldschmidt, E. O. Riecken, and D. Schuppan, "Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile

- duct obliteration in rats," *Hepatology*, vol. 26, no. 3, pp. 643–649, 1997.
- [21] Y.-S. Lee, K.-A. Jang, and J.-D. Cha, "Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 618081, 7 pages, 2012.
- [22] A. A. Boligon, T. G. Schwanz, M. Piana et al., "Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. leaves," *Natural Product Research*, vol. 27, no. 1, pp. 68–71, 2013.
- [23] NCCLS-National Committee for CLinical Laboratory Standards, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, vol. 20, NCCLS Approved Standard M7-A5, Villanova, Pa, USA, 6th edition, 2005.
- [24] J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels, "Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, no. 8, pp. 2720–2722, 2002.
- [25] M. M. Javadpour, M. M. Juban, W.-C. J. Lo et al., "De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 39, no. 16, pp. 3107–3113, 1996.
- [26] H. D. M. Coutinho, J. G. M. Costa, V. S. Falcão-Silva, J. P. Siqueira Jr., and E. O. Lima, "Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, vol. 33, no. 6, pp. 467–471, 2010.
- [27] V. Kuete, J. Kamga, L. P. Sandjo et al., "Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae)," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, article 6, 2011.
- [28] Y. Bibi, S. Nisa, F. M. Chaudhary, and M. Zia, "Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, article 52, 2011.
- [29] F. Hadacek and H. Greger, "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice," *Phytochemical Analysis*, vol. 11, no. 3, pp. 137–147, 2000.
- [30] V. Šimánek, V. Kren, J. Ulrichová, J. Vicar, and L. Cvak, "Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy," *Hepatology*, vol. 32, no. 2, pp. 442–444, 2000.
- [31] V. Křen and D. Walterová, "Silybin and silymarin—new effects and applications," *Biomedical Papers*, vol. 149, no. 1, pp. 29–41, 2005.
- [32] B. P. Jacobs, C. Dennehy, G. Ramirez, J. Sapp, and V. A. Lawrence, "Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis," *The American Journal of Medicine*, vol. 113, no. 6, pp. 506–515, 2002.
- [33] G. L. Dong, K. K. Hyung, Y. Park et al., "Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 26, no. 8, pp. 597–600, 2003.
- [34] D. C. Michelin, P. E. Moreschi, A. C. Lima, G. G. F. Nascimento, M. O. Paganelli, and M. V. Chaud, "Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, no. 4, 2005.
- [35] J. A. S. Zuanazzi and J. A. Montanha, "Flavonóides," in *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, Eds., pp. 577–614, Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brazil, 5th edition, 2004.
- [36] M. Daglia, "Polyphenols as antimicrobial agents," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 174–181, 2012.
- [37] H. Tsuchiya, M. Sato, T. Miyazaki et al., "Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 50, no. 1, pp. 27–34, 1996.
- [38] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.
- [39] C. N. Wendakoon and M. Sakaguchi, "Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices," *Journal of Food Protection*, vol. 58, no. 3, pp. 280–283, 1995.
- [40] H. N. H. Veras, F. F. G. Rodrigues, A. V. Colares et al., "Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 3, pp. 508–512, 2012.
- [41] H. D. M. Coutinho, A. Vasconcellos, M. A. Lima, G. G. Almeida-Filho, and R. R. N. Alves, "Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855)," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 9, no. 1, article 35, 7 pages, 2009.
- [42] Q. Wang, H. Wang, and M. Xie, "Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*," *Archives of Microbiology*, vol. 192, no. 11, pp. 893–898, 2010.
- [43] H. P. Ávila, E. D. F. A. Smânia, F. D. Monache, and A. Smânia, "Structure-activity relationship of antibacterial chalcones," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 22, pp. 9790–9794, 2008.
- [44] Y. Li, Y. Luo, Y. Hu et al., "Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4-oxadiazole scaffold as FabH inhibitors," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 14, pp. 4316–4322, 2012.
- [45] P. M. Salas, G. Céliz, H. Geronazzo, M. Daz, and S. L. Resnik, "Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species," *Food Chemistry*, vol. 124, no. 4, pp. 1411–1415, 2011.
- [46] T. Arif, T. K. Mandal, and R. Dabur, "Natural products: antifungal agents derived from plants," in *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, vol. 81, pp. 283–311, 2011.

4 DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado o efeito antioxidante da Silimarina e seus constituintes. Entretanto, a maior ênfase tem sido dada à proteção contra o dano oxidativo hepático. Desta forma, este estudo direcionou à avaliação da atividade *in vitro* deste extrato-padrão em parâmetros de estresse oxidativo, bem como, de sua atividade sobre as enzimas monoamino oxidase e Na^+/K^+ -ATPase, e ainda, o efeito antimicrobiano da Silimarina e Silibinina e modulador de fármacos antimicrobianos.

Os resultados demonstraram que a Silimarina tem importante capacidade de sequestrar o radical DPPH. Dados da literatura apontam que derivados da espécie *Silybum marianum* têm possuem ação antioxidante, e ainda, promovem o aumento da glutathione, do ácido ascórbico (VALENZUELA *et al.*, 1989) e da atividade da superóxido dismutase (MUZES *et al.*, 1991), além de reduzir os níveis de MDA em ratos tratados com acetaminofeno (NENCINI; GIORGI; MICHELI, 2007).

Enfatiza-se que compostos polifenóis, como flavonoides, são efetivos como antioxidantes, por sua capacidade de sequestrar radicais livres envolvidos na iniciação do processo de peroxidação lipídica (ex.: o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot), protegendo os tecidos contra danos provocados pelo estresse oxidativo, e atuando por sinergismo com outros antioxidantes, além de serem capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

A partir da compreensão de que o cérebro está mais vulnerável à ação de agentes pró-oxidantes (a exemplo do Fe^{2+} e do NPS), dada à sua alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados e baixo nível de defesas antioxidantes (SMITH *et al.*, 2013), investigou-se o efeito antioxidante de Silimarina em tecido cerebral de ratos, através do método de TBARS, no qual foram utilizados diferentes agentes indutores de dano lipídico para avaliar a ação de substâncias na prevenção ou atenuação deste dano, sendo uma técnica largamente empregada para esta finalidade (PUNTEL *et al.*, 2007).

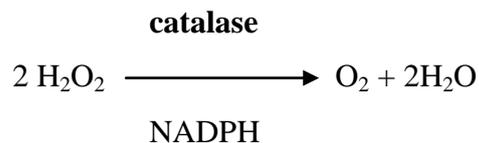
Os resultados demonstraram que a silimarina possui atividade antioxidante *in vitro*, na medida em que diferentes concentrações reduziram a peroxidação lipídica induzida por pró-oxidantes. A partir destes dados, é pertinente mencionar que a análise cromatográfica de

Silimarina revelou majoritariamente os constituintes silibina A (12.75 ± 0.01) e silibina B (15.93 ± 0.03) e ainda, compostos fenólicos como ácido gálico, ácido cafeico e ácido elágico. Portanto, o potencial protetor de Silimarina contra o dano lipídico decorrente do estresse oxidativo parece estar relacionado à complexa mistura de componentes do extrato que poderiam atuar de modo sinérgico.

Os produtos naturais que possuem flavonoides e polifenóis, entre outras classes de metabólitos secundários, apresentam capacidade de proteger contra o estresse oxidativo decorrente da peroxidação lipídica (KREN; WALTEROVÁ, 2005; TROUILLAS *et al.*, 2008). Assim, pesquisas realizadas com Silibina mostraram a sua capacidade de atenuar a produção de MDA decorrente da peroxidação lipídica (LU *et al.*, 2009).

Estudos revelam que a Silimarina possui efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com lipopolissacarídeo (MANAN *et al.*, 1999).

Sabe-se que o sistema de defesa do organismo contra as ERO e ERN é constituído por macromoléculas (enzimas) e micromoléculas, sendo que estas últimas podem também ser originárias da dieta. Assim, a enzima catalase está envolvida nesta proteção por promover a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, conforme demonstrado abaixo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006):



Desse modo, considerando os resultados obtidos sobre a ação da Silimarina na proteção do dano oxidativo aos lipídeos de membrana, investigou-se o seu efeito sobre marcadores enzimáticos de estresse oxidativo. Identificou-se que a Silimarina evitou a diminuição na atividade da catalase causada pelos pró-oxidantes, na concentração de $30 \mu\text{g/ml}$. Neste aspecto, pesquisas demonstram que a redução da atividade da catalase, a exemplo do consumo de defesas antioxidantes em situações de estresse oxidativo (EO), acarretará acúmulo do H_2O_2 , provocando toxicidade às células. Nestas condições, substâncias com potencial antioxidante são definidas como àquelas capazes de, em baixas concentrações, diminuir ou retardar a oxidação de um substrato oxidável, as quais poderiam atuar na manutenção do sistema de defesa diante do EO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998; VALKO *et al.*, 2006).

Ainda nesta perspectiva, os polifenóis apresentam importante capacidade de restaurar a atividade de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, a exemplo da catalase, em condições que demandam o aumento da atividade desta enzima, a exemplo da exposição a agentes pró-oxidantes (SCHAFFER *et al.*, 2013), demonstrando importante propriedade neuroprotetora diante do estresse inflamatório e oxidativo (CALABRESE *et al.*, 2012).

A relevância do H_2O_2 para a produção de estresse oxidativo decorre da sua habilidade em transpor as membranas celulares e gerar o radical hidroxila, sendo capaz de oxidar grupos tiol muito reativos como o contido na glutathiona reduzida (GSH). A GSH, por sua vez, é uma biomolécula, que apresenta importante papel no sistema de defesa antioxidante, função relacionada à presença do grupamento tiol (-SH), atuando em ciclos entre a sua forma oxidada e reduzida, através da atuação de duas enzimas, a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR) (BABIOR, 1997).

Grupos tióis estão envolvidos na manutenção do estado redox intracelular representando, portanto, um parâmetro essencial à preservação da homeostasia diante do estresse oxidativo (SIES, 1999). A Silimarina protegeu a oxidação de grupos tióis (proteico e não-proteico) induzida por agentes pró-oxidantes (Fe^{2+} e NPS) em homogeneizado de cérebro de ratos. Este dado é relevante considerando que os tióis são importantes agentes redutores, dada à capacidade de doar elétrons exercendo papel fundamental na defesa do organismo contra os danos provocados pelo estresse oxidativo (BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002).

Outro resultado importante foi o efeito da Silimarina em ativar a Na^+/K^+ -ATPase em cérebro de ratos. A Na^+/K^+ -ATPase é uma proteína de membrana encontrada nas células animais, responsável pelo transporte de íons Na^+ para fora e K^+ para o interior das células, através da membrana plasmática, desempenhando um papel chave no balanço de fluidos e eletrólitos, sendo que este gradiente é crucial para a manutenção do potencial de membrana (REINHARD *et al.*, 2013). A inibição da Na^+ , K^+ -ATPase compromete de forma significativa o equilíbrio deste potencial de membrana, com consequente elevação do Ca^{2+} intracelular e excitotoxicidade neuronal (ZHANGA *et al.*, 2013).

Tendo em vista a importância da Na^+ , K^+ -ATPase na regulação de processos vitais e ainda, que o decréscimo em sua atividade acarreta eventos tóxicos às células, incluindo a neurotoxicidade (ERECINSKA; SILVER, 1994; ZHANGA *et al.*, 2013), acredita-se na relevância deste dado, uma vez que a Silimarina poderia auxiliar na proteção do Sistema Nervoso Central contra o dano oxidativo, somando-se a isso também, a capacidade antioxidante demonstrada desta substância, neste estudo.

Dessa forma, considerando que o estresse oxidativo, a inflamação, a apoptose, a disfunção mitocondrial, entre outros eventos, estão envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas (SINGH *et al.*, 2011; SIMUNOVIC *et al.*, 2009; SINGHAL *et al.*, 2013), é importante referir que os resultados desta pesquisa apontam para um efeito neuroprotetor da Silimarina contra a peroxidação lipídica em cérebro de ratos. Além disso, este flavonoide também foi capaz de reduzir a atividade das duas isoformas da enzima monoamino oxidase (MAO), sendo que somente a concentração de 300 µg/mL apresentou efeito inibitório sobre a MAO-A, enquanto que a MAO-B foi inibida a partir da concentração de 30 µg/mL.

A avaliação do perfil cinético de inibição da MAO revelou que a Silimarina não alterou o valor de K_m para MAO-A ($27.0 \pm 4.43 \mu\text{M}$) e para MAO-B ($12.47.0 \pm 2.09 \mu\text{M}$), comparado aos valores de K_m obtidos na ausência do extrato ($17.02 \pm 2.50 \mu\text{M}$, MAO-A; $11.56 \pm 1.27 \mu\text{M}$, MAO-B). Entretanto, comparando-se o valor de K_m para MAO-A e MAO-B, na presença da Silimarina, observa-se que para a MAO-B houve uma maior diminuição deste, muito embora, sem valor estatístico. Considerando, portanto, que o K_m mantém uma correlação com a afinidade do substrato pela enzima (NELSON; COX, 2001), os resultados sugerem que a Silimarina teria uma maior afinidade pela MAO-B, o que se reflete na inibição mais acentuada desta isoforma da MAO.

Os resultados mostraram que a Silimarina causou um discreto decréscimo nos valores da $V_{m\acute{a}x}$, na ordem de $0.41 \pm 0.023 \text{ nmol/min/mg}$ de proteína na presença do extrato, para $0.56 \pm 0.024 \text{ nmol/min/mg}$ de proteína na ausência da Silimarina, quando avaliada a atividade sobre a MAO-A. Para a MAO-B, os dados demonstraram um declínio na $V_{m\acute{a}x}$ de $0.54 \pm 0.025 \text{ nmol/min/mg}$ de proteína na presença da Silimarina, para $0.98 \pm 0.028 \text{ nmol/min/mg}$ na ausência do extrato. Vale ressaltar que estes resultados foram significativos para ambas isoformas da MAO.

Comparando-se os valores de $V_{m\acute{a}x}$ para a MAO-A e MAO-B, na presença e na ausência da Silimarina, é possível identificar que este decréscimo foi maior para a MAO-B, o que também é sugestivo de que a interação enzima-substrato conduz a uma inibição mais significativa sobre a MAO-B, com subsequente diminuição da $V_{m\acute{a}x}$ à medida que se aumenta a concentração do inibidor. A literatura afirma que inibidores não-competitivos afetam a $V_{m\acute{a}x}$, sem causar alterações no valor de K_m (NELSON; COX, 2001).

Dados da literatura apoiam que a MAO teria uma importante função na patogenia de doenças neurológicas e psiquiátricas, dada à sua participação no metabolismo de neurotransmissores (BERTON; NESTLER, 2006). Os inibidores da MAO exercem um efeito inibitório através de sua ligação ao sítio ativo da enzima. Outro aspecto importante seria a

perda da seletividade com doses maiores ou repetitivas dos inibidores. Assim, a terapêutica impõem limitações de uso tais como, perturbações do sono, irritabilidade e agitação, alterações cardiovasculares, hipertensão e disfunções sexuais. Nessa perspectiva, sabe-se que fármacos capazes de exercer efeito inibitório sobre a MAO são utilizadas para o tratamento de doenças neurológicas como a depressão, e que especialmente, inibidores seletivos da MAO-B, são empregados no tratamento da DP (YOUUDIM; WEINSTOCK, 2004).

Desta forma, as substâncias com capacidade de inibir seletiva e reversivelmente a MAO, em particular a MAO-B, são amplamente vislumbradas por pesquisadores. Isto se deve ao fato de que a MAO-B corresponde a 80% da MAO total presente em cérebro de humanos e ainda, é a principal responsável pela degradação da β -feniletilamina, a qual promove a liberação de dopamina e inibe sua recaptação. Logo, inibidores da MAO-B possibilitam um aumento nos níveis de dopamina e melhora na transmissão dopaminérgica, o que seria particularmente significativo para pacientes com DP, os quais apresentam elevados níveis de MAO-B no cérebro e conseqüente diminuição de dopamina (CHEN; SWOPE, 2005).

Ainda nesta perspectiva, Ou; Chen; Shih (2006) demonstraram que a inibição da MAO-A previne a apoptose celular e exerce efeito de neuroproteção. Assim, a Silimarina se apresenta, a partir do seu significativo efeito inibitório sobre as isoformas da MAO, como uma substância promissora na investigação de novas terapias para a depressão e/ou DP. Desta forma, flavonoides derivados da espécie *Silybum marianum* (L.) Gaertn., vêm sendo estudados na perspectiva de tratamento de doenças neurodegenerativas em associação ao estresse oxidativo (YIN *et al.*, 2011).

Considerando o envolvimento do EO em diversas patologias, inclusive uma maior predisposição de indivíduos a processos infecciosos, acredita-se que substâncias capazes de atenuar o dano oxidativo a tecidos e órgãos possam também apresentar importante efeito preventivo contra o estresse inflamatório e apoptótico decorrente da geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e de radicais livres. Sabe-se que as EROs e ERNs são geradas durante a fagocitose para neutralizar a invasão microbiana, a exemplo do óxido nítrico (NO), o qual é amplamente produzido pela ação da óxido nítrico sintase induzível (NOSi) ativando macrófagos e neutrófilos durante a reação imunológica. No entanto, estas espécies também podem exercer toxicidade através da geração do peroxinitrito ao reagir com o radical superóxido (GOMES *et al.*, 2008; KOSTKA, 1995). Assim, o peroxinitrito formado pelas células fagocíticas pode, em elevadas concentrações, provocar severos danos a biomoléculas através do estresse nitrosativo, sendo responsável pela ocorrência de várias doenças (HALLIWELL, 1997). Dessa maneira, a resposta inflamatória exagerada pode

predispor a invasão microbiana e ao surgimento de doenças oportunistas e ainda, comprometer o tratamento de infecções.

As doenças infecciosas são responsáveis por percentual significativo de mortes na população mundial, sendo motivo de grande preocupação especialmente, pelo uso inadequado de antimicrobianos no que diz respeito à utilização irracional de antibióticos que favorece a emergência de cepas microbianas multirresistentes (CORREIA *et al.*, 2007; FISHMAN, 2006).

É válido referir o aumento da importância clínica de infecções hospitalares em todo o mundo, sobretudo, associadas a mecanismos de resistência microbiana, o que certamente tem mobilizado pesquisadores a investigar as propriedades de plantas e seus derivados na perspectiva de modificar a ação de antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2008; GURIB-FAKIM, 2006). No Brasil, há relatos de infecções causadas por *S. aureus* resistentes em parte, a antibióticos de elevado espectro como a vancomicina (NOWAKONSKI, 2000).

A investigação do efeito antimicrobiano de extratos de plantas pode ser realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a menor concentração na qual não ocorre nenhum crescimento microbiano (JVADEPOUR *et al.*, 1998), sendo esta considerada irrelevante à prática clínica quando superior a 500 µg/mL (DALL'AGNOL *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2005).

Nesse contexto, combinações de extratos de plantas a antibióticos, em concentrações sub-inibitórias (CIM/8) têm sido utilizadas, sendo uma importante estratégia uma vez que, apresentam baixo risco de aumentar a resistência aos fármacos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; COUTINHO *et al.*, 2008). No entanto, estes também podem influenciar no efeito dos antibióticos, aumentando ou revertendo a ação do fármaco (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Desta forma, os resultados desta pesquisa demonstraram que a Silimarina possui baixa atividade antibacteriana contra as cepas padrão avaliadas, com valores de CIM superiores a 512 µg/mL. A Silibinina também não demonstrou importante efeito antibacteriano contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com valor de CIM de 1.024 µg/mL. No entanto, contra *E. coli*, o valor de CIM foi de 64 µg/mL, sendo relevante do ponto de vista clínico. Os resultados para a atividade antifúngica da Silimarina e Silibinina demonstraram valores de CIM de 1.024 µg/mL para todas as linhagens.

Os dados observados neste estudo apontam para efeito modulador sinérgico quando a Silimarina e a Silibinina estiveram associadas aos antibióticos, especialmente, aos aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) contra as diferentes cepas bacterianas avaliadas.

E ainda, demonstram efeito antagônico quando a Silimarina e a Silibinina foram associadas à nistatina contra as leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kruzei* e nenhum efeito significativo em associação ao mebendazol.

Assim, a Silimarina demonstrou atividade sinérgica na modulação de aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) contra *E. coli*, sendo que o seu componente majoritário (Silibinina) apresentou sinergismo somente quando associado a gentamicina. Este resultado é particularmente importante para bactérias Gram-negativas, as quais possuem uma estrutura da parede celular mais complexa, o que as torna mais resistentes à ação de antibióticos que não conseguem transpô-la de forma efetiva (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Estudos avaliando a atividade antibacteriana de compostos fenólicos demonstram que *S. aureus* e *P. aeruginosa* são mais suscetíveis à ação destes metabólitos secundários do que *E. coli* e *C. albicans* (FATTOUCH *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo mostram que a Silimarina e a Silibinina apresentaram importante atividade de sinergismo na presença dos antibióticos amicacina e ciprofloxacino contra *P. aeruginosa*, sendo que a Silimarina também apresentou significativo efeito sinérgico quando associada à gentamicina para esta mesma cepa bacteriana. O efeito sinérgico de Silimarina em associação ao ciprofloxacino, um antibiótico da classe das fluoroquinolonas que apresenta amplo espectro (CROSS; MANETSCH, 2010), tem importância particular em infecções causadas por bacilos Gram-negativos, e ainda, patógenos multirresistentes aos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos.

Vale salientar que a Silibinina apresentou efeito antagônico quando associada à gentamicina e imipenem/cilastatina sódica contra *P. aeruginosa*. Nesse sentido, muito embora várias pesquisas relatem o efeito de sinergismo que os extratos de plantas possuem associados a antimicrobianos de uso clínico, a atividade antagônica também tem sido referida (COUTINHO *et al.*, 2009; TINTINO *et al.*, 2013; BEHLING *et al.*, 2004; GRANOWITZ; BROWN, 2008).

É importante enfatizar os resultados observados contra *S. aureus*, sendo que a Silimarina e a Silibinina tiveram atividade de sinergismo quando combinados aos antibióticos amicacina, gentamicina e imipenem/cilastatina sódica. Este último, consiste em um antibiótico da classe de carbapenens, os quais são beta-lactâmicos de amplo espectro, estáveis diante de beta-lactamases com atividade contra bacilos Gram-positivos e negativos (MELETIS *et al.*, 2010), que exercem seus efeitos por se ligarem a proteínas fixadoras de penicilina e impedirem a síntese da parede celular (ZHANEL *et al.*, 2007).

Compostos fenólicos possuem a capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares que se ligam à parede celular bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996). Alguns estudos apontam a capacidade de produtos naturais em alterar a permeabilidade da membrana celular e facilitar a penetração do antibiótico (BURT, 2004). Este mecanismo seria particularmente interessante para a ação de aminoglicosídeos, os quais exercem seu efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano, necessitando penetrarem no interior da célula para agir (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

O potencial antibacteriano de flavonoides estaria também relacionado à presença de grupos fenólicos hidroxila que interferem na síntese bacteriana por mecanismos de inibição enzimática (ÀVILA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012).

A partir do exposto, compreende-se ser relevante a busca por novos agentes terapêuticos antimicrobianos os quais ofereçam alternativas aos tratamentos de infecções provocadas por patógenos resistentes, sejam estes de origem vegetal, animal ou sintéticos.

5 CONCLUSÕES

Este estudo foi realizado a partir da perspectiva de que o extrato-padrão da Silimarina, amplamente utilizado para várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, poderia exercer influência antioxidante em testes *in vitro*, utilizando-se de homogeneizado de cérebro de ratos, bem como, alterar o *status* enzimático de importantes enzimas envolvidas no funcionamento do Sistema Nervoso Central, como a Na^+/K^+ -ATPase e a monoamino oxidase.

As análises cromatográficas da Silimarina confirmaram a presença de silibina A, silibina B e compostos fenólicos como, o ácido gálico, o ácido cafeico e o ácido elágico, sendo portanto, um composto promissor para avaliações de capacidade antioxidante. A Silimarina possui efeito antioxidante *in vitro* e foi capaz de proteger contra o dano oxidativo aos lipídeos de membrana na presença de pró-oxidantes. Nesse contexto, conclui-se que a Silimarina se apresenta como um composto antioxidante com potencial para uso em problemas de saúde associados ao estresse oxidativo. Sugere-se também que os constituintes químicos da Silimarina podem interagir com a membrana celular atuando na proteção contra a peroxidação lipídica.

A Silimarina também protegeu contra a oxidação dos grupos tióis proteicos e não proteicos, na presença de pró-oxidantes e, foi capaz de evitar uma diminuição na atividade da catalase causada pelos pró-oxidantes. Esses dados são promissores uma vez que substâncias (a exemplo de flavonoides) com habilidade de prevenir a degradação do sistema de defesa antioxidante são vislumbradas para o tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo.

Os resultados demonstraram que a Silimarina foi capaz de ativar a Na^+/K^+ -ATPase, ao passo em que inibiu a atividade da MAO-A e MAO-B, sendo que a inibição da MAO-B foi bem mais pronunciada. Reconhecendo a relevância de inibidores da enzima monoamina oxidase para o tratamento de doenças neurológicas (como a Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer), pode-se inferir que a Silimarina possui potencial terapêutico para doenças que afetam o Sistema Nervoso Central, e que os resultados obtidos permitem sugerir que a Silimarina apresenta uma perspectiva ampliada de uso para a Doença de Parkinson. É possível concluir, portanto, que a Silimarina altera as atividades da Na^+/K^+ -ATPase e monoamina oxidase, indicando que o seu efeito neuroprotetor não está apenas associado com sua capacidade antioxidante.

A Silimarina e a Silibinina não apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica clinicamente relevante. A Silibinina demonstrou atividade antibacteriana clinicamente significativa contra *Escherichia coli*. Ambas demonstraram atividade sinérgica na resistência microbiana, em especial com os aminoglicosídeos, contra as bactérias multirresistentes. Nesse contexto, o potencial modulador, especialmente de sinergismo, quando a Silimarina e a Silibinina foram associadas a drogas antibacterianas, sugere uma possibilidade terapêutica adjuvante para ultrapassar o problema das infecções bacterianas provocadas pela resistência aos antibióticos.

Esta pesquisa reafirma o potencial antioxidante *in vitro* da Silimarina e aponta caminhos para uma possível ação neuroprotetora, dada a interação e subsequente, alteração da atividade de importantes enzimas envolvidas na regulação do funcionamento do Sistema Nervoso Central. A partir dos resultados, a Silimarina desponta como substância com capacidade para o tratamento de doenças neurológicas que apresentem também, correlação com o estresse oxidativo.

6 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Os resultados deste estudo apontam que Silimarina tem potencial antioxidante *in vitro* e altera a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, e de ambas isoformas da enzima monoamino oxidase. Não obstante, Silimarina e Silibinina têm importante efeito sinérgico na modulação com drogas antibacterianas, particularmente, com aminoglicosídeos. Nesse sentido, os dados desta pesquisa vislumbram como perspectivas:

- Estudos *in vivo* em modelos alternativos (*Drosophila melanogaster*) para avaliação do efeito de Silimarina em parâmetros de estresse oxidativo e alterações comportamentais;
- Estudos *in vivo* para investigação de atividade em processos patológicos a nível de Sistema Nervoso Central;
- Ensaios *in vivo* para explorar o potencial adjuvante de Silimarina e Silibinina na terapêutica contra bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

ADLER, C. H. Premotor symptoms and early diagnosis of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, p. 3-8, 2011.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-125, 1984.

ANDREASSEN, O. A.; JORGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesia in rats. Implications for tardive dyskinesia? **Progress in Neurobiology**, v. 61, p. 525-541, 2000.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 283-311, 2011.

ATAWIA, R. T. *et al.* Role of the phytoestrogenic, pro-apoptotic and anti-oxidative properties of sylimarin in inhibiting experimental benign prostatic hyperplasia in rats. **Toxicology Letters**, v. 219, p. 160-169, 2013.

ÁVILA, P. H. *et al.* Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9790-9794, 2008.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BAGH, M. B. *et al.* Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 6, n. 42, p. 574-581, 2008.

BANNWART, C. F. *et al.* Inhibitory effect of silibinin on tumor necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide production by human monocytes. **Natural Product Research**, v. 24, n. 18, p. 1747-1757, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre espécies reativas de oxigênio e a defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

- BATES, J. N. *et al.* Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 157-165, 1991.
- BEHLING, E. B. *et al.* Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 137-151, 2006.
- BINDA, C. *et al.* Lights and shadows on monoamine oxidase inhibition in neuroprotective pharmacological therapies. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 2788-2796, 2011.
- BOIGK, G. *et al.* Sylimarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 643-649, 1997.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Med**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.
- BROWN, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, p. 188-191, 1995.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CALABRESE, V. *et al.* Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 753-783, 2012.
- CHEN, J. *et al.* Inhibition of growth of *Streptococcus mutans*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and vancomycin-resistant *Enterococci* by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sophora flavescens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3574-3575, 2005.
- CHEN, J. *et al.* Sodium nitroprusside degenerates cultured rat striatal neurons. **NeuroReport**, v. 2, p. 121-123, 1991.

CHEN, J. J.; SWOPE, D. M. Clinical pharmacology of rasagilina: a novel, second-generation propargylamine for the treatment of Parkinson's disease. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 45, p. 878-994, 2005.

CHOIL, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 153, p. 1161-1168, 2002.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CONNOR, JR. Evidence for iron mismanagement in the brain in neurological disorders. In: CONNOR, JR., editor. Metal and oxidative damage in neurological disorders. **New York: Plenum Press**, p. 23-40, 1997.

COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 290-309, 1999.

CORREIA, D. *et al.* Perfil de utilização de antimicrobianos de reserva terapêutica em um hospital privado do Brasil. **Revista de la O.F.I.L. Lisboa**, v. 17, n. 2, p. 23-29, 2007.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement to the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*. **Indian Journal Medical Residency**, v. 129, p. 566-568, 2009.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Increasing of the Aminoglycoside Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine. **Biological Research for Nursing**, v. 11, p. 332-335, 2010.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. **The New York Botanical Garden**, p. 261-449, 1988.

CROSS, R. M.; MANETSCH, R. Divergent Route: Access Structurally Diverse 4-Quinolones via Mono or Sequential Cross-Couplings. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 17, p. 23-40, 2010.

DALL'AGNOL, R. *et al.* Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DAVID, J. P. de L.; DAVID, J. M. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. In: PENILDON, S. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 22, p. 149-159, 2006.

DAWSON, V. L. *et al.* Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 6368-6371, 1991.

DEDEOGLU, A. *et al.* Mice overexpressing 70-kda heat shock protein show increased resistance to malonate and 3-nitropropionic acid. **Experimental Neurology**, v. 17, p. 262-265, 2002.

DIAZ *et al.* Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 2215-2217, 1998.

DIETZMANN, J. *et al.* Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in perinuclear blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 1347-1354, 2002.

DIXIT, N. *et al.* Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approach. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 172-179, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUGAS, Jr. A. J. *et al.* Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 327-331, 2000.

EI-MALLAKH, R. S.; LI, R. Is the Na⁺-K⁺-ATPase the link between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 5, p. 361-368, 1993.

EI-MALLAKH, R. S.; WYATT, R. J. The Na, K-ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biological Psychiatry**, v. 37, p. 235-244, 1995.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 7, 1959.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ELMER, L. W.; BERTONI, J. M. The increasing role of monoamine oxidase type B inhibitors in Parkinson's disease therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 16, p. 2759-2772, 2008.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 43, p. 37-71, 1994.

FATTOUCH, S *et al.* Antimicrobial activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 963-969, 2007.

FEANY, M. B. New approaches to the pathology and genetics of neurodegeneration. **American Journal of Pathology**, v. 176, p. 2058-2066, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FISHMAN, N. Antimicrobial stewardship. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. 4-73, 2006.

FOLMER, V. *et al.* High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na^+/K^+ -ATPase but not on σ -aminolevulinatase in mice. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 333-341, 2004.

FOWLER, Z. L. *et al.* Development of no-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLoS one**, v. 6, n. 10, p. 1-5, 2011.

GARCIA-VIDAL, C.; CARRATALÀ, J. Patogenia de la infecció fúngica invasora. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, p. 151-158, 2012.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; LIU, F. Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 18, p. 148-157, 1980.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2011.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 263-277, 2004.

GILANI, A. H.; ATTA-ur-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 43-49, 2005.

GOMES, A. *et al.* Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1586-1605, 2008.

GOMES, A. *et al.* Molecular mechanisms of antiinflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1586-1605, 2008.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas e terapêuticas de Goodman & Gilman**. Traduzido por: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. 12. ed. Mc Graw Hill, Artmed. 2012.

GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. *Critical Care Clinics*, v. 24, p. 421-442, 2008.

GREENE, M. *et al.* A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labeling. *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, p. 1989-1994, 1993.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. *Drugs*, v. 69, p. 65-73, 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. v. 27, p. 91-93, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. **FEBS Letters**, v. 128, p. 343-346, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford UK: Oxford University Press. 1998.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? **FEBS Letters**, v. 411, p. 157-160, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, v. 128, p. 347-352, 1981.

HEIDELBERG, B. **Fitoterapia**. São Paulo: Editora Manole, 2001.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.

HUBER, A. *et al.* Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 837-847, 2008.

JAVADEPOUR, M. M. *et al.* A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

JENNER, P. Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 63, p. 13-22, 2004.

JIA, Z.; MISRA, H. P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 288-298, 2007.

JOVICIC, M. E. *et al.* Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na, K-ATPase in the rat. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 1, n. 14, p. 85-93, 2008.

JUNIOR, M. A. S.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, p. 152-174, 2004.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine Biology**, New York, v. 366, p. 351-376, 1994.

KATIYAR, S. K. *et al.* Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 8, p. 556-566, 1997.

KONOWALCHUK, J.; DICKIE, N. S.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 775-779, 1977.

KOSTKA, P. Free radicals (nitric oxide). **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 411R-416R, 1995.

KREN, V.; WALTEROVÁ, D. Silybin and silymarin – new effects and applications. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 149, p. 29-41, 2005.

KUMANOTO, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 386-391, 2011.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1325-1334, 2010.

KYUNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 96-104, 2008.

LANGSTON, J. W. *et al.* Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. **Science**, v. 225, p. 1480-1482, 1984.

LEWERENZ, J.; LETZ, J. METHNER, A. Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 2. p. 522-531, 2003.

LI, Y. *et al.* Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4316-4322, 2012.

LIGERET, H. *et al.* Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation warm reperfusion liver injury. **Journal Ethnopharmacology**, v. 115, p. 507-514, 2008.

LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infectious Disease**, v. 36, p. 11-23, 2003.

LOGUERCIO, C.; FESTI, D. Silybin and the liver: From basic research to clinical practice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 2288-2301, 2011.

LOHR, J. B. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. **Archives of General Psychiatry**, v. 48, p. 1097-1106, 1991.

LOWRY O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275.1951.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520-532, 1998.

LUTHMAN, M.; HOLMGERN, A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. **Biochemical Journal**, v. 21, p. 6628-6633, 1982.

MAIESE, K. *et al.* Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutics. **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 217-234, 2010.

MANDEGARY, A. *et al.* Hepatoprotective effect of silymarin in individuals chronically exposed to hydrogen sulfide; modulating influence of TNF- α cytokine genetic polymorphism. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 28, 2013.

MANNA, S. K. *et al.* Silymarin suppress TNF-induced activation of NF-kB, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 6800-6809, 1999.

MARTIN, S. J.; YOST, R. J. Infectious diseases in the critically ill patients. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 24, p. 35-43, 2011.

MELETIS, G. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM and blaKPC genes. **Hippokratia**, v. 2, p. 139-140, 2010.

MIADONNA, A. *et al.* Effects of silybin on histamine release from human basophil leucocytes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 747-752 1987.

MICHEL, P. P. *et al.* Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 2, p. 289-297, 2007.

MINGHETTI, L.; LEVI, G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 99-125, 1998.

MÜZES, G. *et al.* Effect of the bioflavonoid silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 78, p. 3-9, 1991.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistance bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, 247-256, 2000.

NECKAMEYER, W.; QUINN, W. G. Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* Tyrosine Hydroxylase. **Neuron**, v. 2, p. 1167-1175, 1989.

NENCINE, C.; GIORGI, G.; MICHELI, L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. **Phytomedicine**, v. 14, p. 129-135, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 233-239, 1999.

NOWAKONSKI, A. V. Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e outros cocos gram positivo. **Manual de Procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar**. Serviço de Microbiologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, 2000.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, D. R. *et al.* Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 1265-1270, 2011.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

OU, X.; CHEN, K.; SHIH, J. C. Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway. **PNAS**, 103: 10923-10928, 2006.

OWEN A. D. *et al.* Indices of oxidative stress in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. **Journal of Neural Transmission**, p. 167-173, 1997.

PADURARIU, M. *et al.* Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. **Neuroscience Letters**, v. 479, p. 317-320, 2010.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arms entries in elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149- 167.1985.

PEMÁN, J.; SALAVERT, M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, p. 90-98, 2012.

PÉREZ-SEVERIANO, F. *et al.* S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. **Neurochemistry**, v. 45, p. 1175-1183, 2004.

PIGRAU, C.; ALMIRANTE, B. Oxazolidinones, glycopeptides and cyclic lipopeptides. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 4, p. 236-246, 2009.

PUNTEL, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in the quinolinic acid, but not in the malonate pro-oxidative activity in vitro. **Neurochemistry Research**, v. 30, p. 417-424, 2005.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAPP, R. P. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. **Pharmacotherapy**, v. 24, p. 4-28, 2004.

RAUHALA, P. *et al.* Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, 1065-1073, 1998.

REINHARD, L. *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase as a docking station: protein–protein complexes of the Na⁺, K⁺-ATPase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 205-222, 2013.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RUBINSTEIN, M. *et al.* Adaptative mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treat mice. **Journal Pharmacology and Expetimental Therapeutics**, v. 25, p. 810-816, 1990.

SAKAI, K. *et al.* Induction of major histocompatibility complex I class molecules on human neuroblastoma line cells by a flavonoid antioxidant. **Neuroscience Letters**, v. 298, p. 127-130, 2001.

SALAS, P. M. Antifungal activity and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1411-1415, 2011.

SALLER, R.; MEIER, R.; BRIGNOLI, R. The use of Silymarin in the treatment of liver diseases. **Drugs**, v. 61, p. 2035-2063, 2001.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. (Org.) **Radicais livres e resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: Ed. ULBRA, 2004. 204p.

SANT'ANNA, G. S. *et al.* Ultrasound promoter synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 546-549, 2009.

SCHAFFER, L. F. *et al.* *Harpagophytum procumbens* prevents oxidative stress and loss of cell viability *in vitro*. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 2256-2267, 2013.

SEGATO, F. **Expressão gênica envolvida nos mecanismos de resistência à acriflavina, griseofulvina e terbinafina em fungos filamentosos**. 2008. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2008.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, 916–921, 1999.

SILVA, C. G. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmaceutical Research**, v. 52, p. 229-233, 2005.

SILVA, M. B. *et al.* Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SIMÁNEK, V. *et al.* Silymarin: What is in the name? An appeal for a change of editorial policy. **Hepatology**, v. 32, p. 442-444, 2000.

SIMUNOVIC, F. *et al.* Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. **Brain**, v. 132, p. 1795-1809, 2009.

SINGH, A. K. *et al.* Nigrostriatal proteomics of cypermethrin-induced dopaminergic neurodegeneration: microglial activation dependent and independent regulations. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 526-538, 2011.

SINGHAL, N. K. *et al.* Silymarin- and melatonin-mediated changes in the expression of selected genes in pesticides-induced Parkinsonism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, p. 47-58, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMITH, J. A. *et al.* Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 764-775, 2013.

SULTANA, R.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 2215-2220, 2004.

TANAKA, J. C. A. *et al.* Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TEPE, B. *et al.* *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1132-1137, 2004.

TINTINO, S. R. *et al.* Atividade extracts in modulating ethanol and hexane root of *Costus cf. arabicus* of antimicrobial drugs. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 157-162, 2013.

TROUILLAS, P. *et al.* Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 1054-1063, 2008.

TSIMOGIANNIS, D. L.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40- hydroxy substituted members. **Food Science Emerging Technologies**, v. 7, p. 140-146, 2006.

TSUCHIYA, H. *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-34, 1996.

VALENZUELA, A. *et al.* Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. **Planta Medica**, v. 55, p. 420-422, 1989.

VALENZUELA, A.; GUERRA, R. Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. **FEBS Letters**, v. 181, p. 291-294, 1985.

VALKO, M. *et al.* Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VERHOEFF, J. *et al.* A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 461-466, 1999.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; BRANQUINHA, M. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 582 p.

VILLARINHO, J. G. *et al.* Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, p. 107-114, 2012.

WAGNER, C. *et al.* Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. **Brain Research**, v. 1107, 192-198, 2006.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICHI, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-110, 2009.

WANG *et al.* Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 2103-2112, 2002.

YIN, F. *et al.* Silibinin: A novel inhibitor of A β aggregation. **Neurochemistry International**, v. 58, p. 399-403, 2011.

YOUDIM, M. B. H.; WEINSTOCK, M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 1-2, p. 243-250, 2004.

YOUDIM, M. B.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 287-296, 2006.

YOUDIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 295-309, 2006.

ZANATTA, L. M. *et al.* In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 34, p. 1265-1269, 2001.

ZELANTE, T. *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **European Journal Immunology**, v. 37, p. 2695-2706, 2007.

ZHAN, H. *et al.* Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. **Neurological Research**, v. 26, n. 1, p. 35-40, 2004.

ZHANEL, G. G. *et al.* Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Drugs**, v. 69, p. 809-831, 2009.

ZHANGA, L. *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 96-103, 2013.