



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GASTROPROTETOR DA**  
**SILIMARINA E SILIBINA FRENTE A INFECÇÃO POR**  
***Helicobacter pylori* E EM CÉLULAS TUMORAIS GÁSTRICAS**

**MILENA LOPES FRANCISCO BITTENCOURT**

**VITÓRIA**  
**2019**



Milena Lopes Francisco Bittencourt

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GASTROPROTETOR DA  
SILIMARINA E SILIBINA FRENTE A INFECÇÃO POR  
*Helicobacter pylori* E EM CÉLULAS TUMORAIS GÁSTRICAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do  
Espírito Santo, como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

VITÓRIA  
2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

B624a Bittencourt, Milena Lopes Francisco, 1987-  
Avaliação do potencial gastroprotetor da silimarina e silibina  
frente a infecção por *Helicobacter pylori* e em células tumorais  
gástricas / Milena Lopes Francisco Bittencourt. - 2019.  
77 f. : il.

Orientadora: Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Produtos naturais. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Inflamação -  
Aspectos imunológicos. 4. Gastrite. 5. Aparelho digestivo -  
Câncer. 6. Adenocarcinoma. I. Gonçalves, Rita de Cássia Ribeiro.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. III. Título.

CDU: 615.1

---

Milena Lopes Francisco Bittencourt

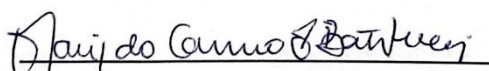
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GASTROPROTETOR DA  
SILIMARINA E SILIBINA FRENTE A INFECÇÃO  
POR *HELICOBACTER PYLORI* E EM CÉLULAS TUMORAIS  
GÁSTRICAS**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 30/09/2019 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

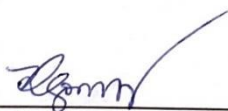
**BANCA EXAMINADORA:**



**Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gobbi Amorim / UVV**



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pimentel Batitucci / UFES**



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cassia Ribeiro Gonçalves (orientadora) / UFES**

Vitória/ES

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter sido meu esteio nessa caminhada e por ter me dado sabedoria para lidar com todas as dificuldades apresentadas no caminho.

Aos meus pais, Raimundo e Marta, pelo apoio incondicional, por todo amor e confiança e por sempre terem sido meus principais incentivadores no meu processo de crescimento acadêmico e profissional, desde a graduação. Essa conquista é nossa!

Aos meus irmãos, Flávio e Bruno, obrigada por serem meus eternos parceiros, saber que posso contar com vocês foi essencial nessa trajetória.

Ao meu marido, Leandro, pelo companheirismo, pela eterna paciência, por sonhar os meus sonhos junto comigo e por compreender os diversos momentos de ausência e cansaço, sempre com uma palavra de amor e carinho.

À minha querida orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia, por ter confiado no meu trabalho e me proporcionado essa oportunidade apesar de alguns anos fora da academia. Obrigada por ter sido tão generosa e ter compartilhado tanto conhecimento comigo. Você é um exemplo da melhor balança entre ser profissional, mulher e mãe. Palavras não serão suficientes para lhe agradecer!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Kitagawa, obrigada pela generosidade em partilhar seus conhecimentos comigo.

À UFES, a qual tenho orgulho de pertencer, por me tornar uma profissional mais qualificada e, acima de tudo, uma cidadã melhor. Ao PPGCFar, tanto os professores quanto aos funcionários, obrigada por toda disponibilidade e por todo o conhecimento adquirido e partilhado.

Aos colegas do Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, pelos momentos partilhados, tanto de trabalho quanto de diversão. Vocês tornaram o mestrado muito mais leve e prazeroso. Um agradecimento especial a Jessyca por todas as palavras de carinho, incentivo e amizade, você tem um lugar especial em meu coração e é parte essencial dessa conquista.

Ao LUCAR, pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura. Em especial ao técnico Flávio e a doutoranda Laryssa que disponibilizaram seu tempo para o preparo das lâminas e captura das fotos.

Aos colegas e funcionários da SESA, por entenderem minha jornada dupla e pelas palavras de incentivo sempre que percebiam o meu cansaço.

À FAPES e CAPES pelo apoio financeiro.

*“Ninguém nasce feito. É experimentando-nos  
no mundo que nós nos fazemos.”*

Paulo Freire

## RESUMO

A fitoterapia é uma importante opção terapêutica na prevenção e tratamento de agravos de saúde. O *Silybum marianum* (L.) Gaertn é uma planta conhecida popularmente como “cardo mariano”. A partir desta planta é possível obter a silimarina, uma mistura complexa de flavolignanas utilizada no Brasil como medicamento fitoterápico como hepatoprotetor, que possui como componente majoritário a silibina. Apesar de ter muitos estudos com a silimarina, ainda pouco se sabe sobre seus efeitos no sistema gástrico. As doenças relacionadas ao estômago são condições comuns que na maioria das vezes levam a cronicidade, podendo evoluir para câncer. Um dos fatores que contribui para seu desenvolvimento é a presença da bactéria *Helicobacter pylori*. A bactéria é capaz de colonizar e infectar o estômago produzindo uma série de alterações que a longo prazo podem culminar no desenvolvimento de câncer gástrico. Neste sentido, buscamos avaliar o efeito da silimarina e silibina sobre *H. pylori*, resposta imonumoduladora de macrófagos e atividade citotóxica sobre linhagem de células tumorais gástricas. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e posteriormente a verificação da atividade sinérgica com o metronidazol pelo método de *checkerboard*. Avaliação das alterações morfológicas na célula bacteriana foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura após exposição da bactéria aos sub-CIM. Também foi realizada a avaliação da interação com subunidade de PBP por método *in silico*. A avaliação da inibição da urease foi realizada *in vitro*. A atividade imunomoduladora foi avaliada pela detecção de óxido nítrico, ânion superóxido e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) liberadas por macrófagos. Por fim, avaliou-se a atividade citotóxica em células de adenocarcinoma gástrico (AGS) pelo método de MTT. Também foi avaliada a citotoxicidade após metabolização. A silimarina e a silibina demonstraram ter discreta atividade sobre *H. pylori*, não demonstrando efeito sinérgico com o metronidazol. Demonstrou importantes alterações morfológicas da parede bacteriana após tratamento, sugerindo interação com subunidades de PBPs. Além disso, a silibina demonstrou possui importante interação *in silico* em modelo de interação com PBP. Em relação à urease, não foi verificada atividade inibitória significativa. Foi observado potencial imunomodulador na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  com inibição das citocinas produzidas por macrófagos estimulados com *H. pylori* (TNF- $\alpha$ :  $84,54 \pm 2,24\%$  e  $100,00 \pm 3,47\%$ , IL-6:  $88,66 \pm 1,56\%$  e  $56,83 \pm 6,69\%$ , IL-10:  $73,88 \pm 3,86\%$  e  $70,29 \pm 8,41\%$  para silimarina e silibina, respectivamente) e NO ( $95,05 \pm 7,76\%$  e  $73,33 \pm 7,14\%$  para silimarina e silibina). Apresentou, na mesma concentração, ação inibitória discreta na produção de superóxido ( $35,85 \pm 10,98\%$  e  $27,09 \pm 7,47\%$  para silimarina e silibina). Além disso, demonstraram significativa atividade citotóxica sobre AGS (IC<sub>50</sub>:  $46,27 \pm 1,99$  e  $55,70 \pm 2,14$   $\mu\text{g/mL}$  para silimarina e silibina) com bom índice de seletividade (IS: 2,12 e 1,52 para silimarina e silibina) quando comparadas ao quimioterápico padrão. E aumento da citotoxicidade após metabolização, com diminuição do IC<sub>50</sub>. Assim, a silimarina e a silibina demonstraram possuir características importantes para um potencial uso na prevenção e tratamento de infecção por *H. pylori* e suas complicações, como o câncer gástrico.

**Palavras chave:** Silimarina, silibina, *Helicobacter pylori*, urease, inflamação, câncer gástrico.

## ABSTRACT

Phytotherapy is an important therapeutic option in the prevention and treatment of health problems. *Silybum marianum* (L.) Gaertn is a plant popularly known as "cardo mariano". From the plant it is possible to obtain silymarin, a complex mixture of flavolignans used in Brazil as a phytotherapeutic medicine as a hepatoprotective, which has silibinin as its major component. Despite having many studies with silymarin, little is known about its effects on the gastric system. Diseases related to the stomach are common conditions that most often lead to chronicity and can progress to cancer. One of the contributing factors for its development is the presence of *Helicobacter pylori* bacteria. The bacterium can colonize and infect the stomach producing a series of changes that in the long run can culminate in the development of gastric cancer. In this sense, we sought to evaluate the effect of silymarin and silibinin on *H. pylori*, macrophage immunomodulatory response and cytotoxic activity on gastric tumor cell line. The broth microdilution technique was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and then to verify the synergistic activity with metronidazole by the checkerboard method. Evaluation of morphological changes in the bacterial cell was performed by scanning electron microscopy after exposure of the bacteria to sub-MICs. It was also performed the evaluation of the interaction with subunit of PBP by *in silico* method. Evaluation of urease inhibition was performed *in vitro*. Immunomodulatory activity was assessed by the detection of nitric oxide and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) released by macrophages. Finally, cytotoxic activity in gastric adenocarcinoma cells (AGS) was assessed by the MTT method. Cytotoxicity after metabolization was also evaluated. Silymarin and silibinin showed a discrete activity on *H. pylori*, showing no synergistic effect with metronidazole. Regarding urease, no significant inhibitory activity was observed. A potential immunomodulatory was observed at 50  $\mu\text{g/mL}$  with inhibition of cytokines produced by *H. pylori* stimulated macrophages (TNF- $\alpha$ :  $84.54 \pm 2.24\%$  and  $100.00 \pm 3.47\%$ , IL-6:  $88.66 \pm 1.56\%$  and  $56.83 \pm 6.69\%$ , IL-10:  $73.88 \pm 3.86\%$  and  $70.29 \pm 8.41\%$  for silymarin and silibinin respectively) and NO ( $95.05 \pm 7.76\%$  and  $73.33 \pm 7.14\%$  for silymarin and silibinin). At the same concentration, it presented a mild inhibitory action on superoxide production ( $35.85 \pm 10.98\%$  and  $27.09 \pm 7.47\%$  for silymarin and silibinin). In addition, they demonstrated significant cytotoxic activity on AGS (IC<sub>50</sub>:  $46.27 \pm 1.99$  and  $55.70 \pm 2.14$   $\mu\text{g/mL}$  for silymarin and silibinin) with good selectivity index (IS: 2.12 and 1.52 for silymarin and silibinin) when compared to standard chemotherapy. And increased cytotoxicity after metabolization, with decreased IC<sub>50</sub>. Thus, silymarin and silibinin have been shown to possess important characteristics for potential use in the prevention and treatment of *H. pylori* infection and its complications, such as gastric cancer.

**Key words:** Silymarin, silibinin, *Helicobacter pylori*, urease, inflammation, gastric cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Imagem da espécie vegetal <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. ....	16
<b>Figura 2</b> - Estrutura química das principais flavolignanas que compõem a silimarina. ....	17
<b>Figura 3</b> - Fatores envolvidos na infecção por <i>H. pylori</i> que levam a carcinogênese .....	24
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática para avaliação do efeito sinérgico pelo método de <i>checkerboard</i> .....	33
<b>Figura 5</b> - Efeito de concentrações crescentes de silimarina e silibina sobre o crescimento de <i>H. pylori</i> .....	42
<b>Figura 6</b> - Microscopia eletrônica de varredura de <i>H. pylori</i> (aumento de 15.000x) sobre os diferentes tratamentos .....	44
<b>Figura 7</b> - <i>Redocking</i> e <i>Cross-docking</i> do ligante biapenem no sítio ativo de PBP .....	45
<b>Figura 8</b> - Poses de <i>docking</i> para silibina no sítio ativo de PBP de <i>H.pylori</i> ....	46
<b>Figura 9</b> - Atividade citotóxica da silimarina e silibina em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.....	47
<b>Figura 10</b> - Efeito da silimarina e silibina na produção de A) TNF- $\alpha$ e B) IL-6 em macrófagos estimulados por <i>H. pylori</i> .....	50
<b>Figura 11</b> - Efeito inibitório da produção de óxido nítrico expresso em concentração de nitrito em $\mu$ M para silimarina e silibina em macrófagos estimulados por <i>H. pylori</i> .....	51
<b>Figura 12</b> – Efeito A) Indutor na produção da citocina IL-10 por silimarina e silibina em macrófagos não ativados e B) inibitório na produção da IL-10 por silimarina e silibina em macrófagos estimulados por <i>H. pylori</i> .....	52
<b>Figura 13</b> - Efeito da silimarina e silibina na redução da produção do ânion superóxido em macrófagos estimulados por <i>H. pylori</i> .....	53
<b>Figura 14</b> - Efeito da silimarina e silibina na captura direta de óxido nítrico por ensaio químico .....	54
<b>Figura 15</b> - Efeito da silimarina, silibina e cisplatina (padrão) em cultura celular de adenocarcinoma gástrico (AGS) em 48 horas e 72 horas.....	55
<b>Figura 16</b> - Efeito comparativo da silimarina, silibina e ciclofosfamida mediante a ausência ou presença do sistema de metabolização fração S9 em cultura celular de AGS em 48 horas de tratamento .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Tratamentos de primeira linha para a infecção com <i>H. pylori</i> segundo o Consenso Brasileiro de Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .....	26
<b>Tabela 2</b> - Valores de ICIF para cada tipo de interação.....	33
<b>Tabela 3</b> - Valores de CIM e CBM das substâncias testadas para as cepas 43504 e 43629 de <i>H. pylori</i> . .....	43
<b>Tabela 4</b> - Resultados de <i>redocking</i> e <i>docking</i> cruzado para biapenem no sítio ativo de PBP.....	45
<b>Tabela 5</b> - Resultados de <i>docking</i> para Silibina no sítio ativo de PBP de <i>H.pylori</i> .....	46
<b>Tabela 6</b> - Índice de seletividade para a silimarina, silibina e cisplatina. ....	55
<b>Tabela 7</b> - Índice citotóxico (IC <sub>50</sub> ) da silimarina, silibina e ciclofosfamida com e sem sistema de metabolização em células AGS.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AGS** - Adenocarcinoma Gástrico

**BHI** - *Brain heart infusion*

**CagA** - *Citotoxin associated gene A*

**CBM** - Concentração bactericida mínima

**CE<sub>50</sub>** - Concentração efetiva 50%

**CIF** - Concentração inibitória fracionada

**CIM** - Concentração inibitória mínima

**CLSI** - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**DMEM** - Dulbecco's modified eagle medium

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**ERO** - Espécies reativas de oxigênio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**HOCl** - Ácido hipocloroso

**HP-NAP** - Proteínas de ativação de neutrófilo de *H. pylori*

**IC<sub>50</sub>** - Índice citotóxico 50%

**ICIF** - Concentração inibitória fracionada

**IL-10** - Interleucina 10

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-8** - Interleucina 8

**iNOS** - Óxido nítrico sintase induzíveis

**IS** - Índice de seletividade

**KOH** - Hidróxido de potássio

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MTT** - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

**NADPH** - Nicotinamida adenina difosfato

**NaNO<sub>2</sub>** - Nitrito de sódio

**NF-κB** - Fator de transcrição nuclear kappa B

**NO** - Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Nitrito

**NOS** - Óxido nítrico sintase

**O<sup>2-</sup>** - Radical superóxido

**PBS** - Tampão fosfato de sódio

**PBP** - *Penicilin Binding Protein*

**RMSD** - Desvio médio quadrático

**SFB** - Soro fetal bovino

**SB** – Silibina

**SM** – Silimarina

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral alfa

**VacA** - *Vacuolating cytotoxin A*

**VEGF** - Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 ESPÉCIE VEGETAL: <i>Silybum marianum</i> .....	15
<b>1.1.1 Composição química</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2 Propriedades farmacológicas</b> .....	<b>17</b>
1.2 DOENÇAS GÁSTRICAS .....	19
<b>1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	<b>20</b>
1.2.1.1. Tratamento .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1. GERAL .....	28
2.2. ESPECÍFICOS .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBTENÇÃO DA SILIMARINA E SILIBINA .....	29
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>H. pylori</i> .....	29
<b>3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.3 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.4 Avaliação <i>in silico</i> das interações com PBP</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.5 Avaliação do sinergismo da silimarina e silibina com o metronidazol sobre <i>H. pylori</i></b> .....	<b>32</b>
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE.....	34
3.4 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES .....	34
<b>3.4.1 Macrófagos murinos (RAW 264.7)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Adenocarcinoma gástrico (AGS)</b> .....	<b>35</b>
3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....	35
<b>3.5.1 Macrófagos murinos (RAW 264.7)</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5.2 Adenocarcinoma gástrico (AGS)</b> .....	<b>36</b>
3.5.2.1 Citotoxicidade em adenocarcinoma gástrico (AGS) associada a um sistema de metabolização .....	36
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	37
<b>3.6.1 Efeito da silimarina e da silibina sobre a ativação de macrófagos</b> .....	<b>37</b>
3.6.1.1 Avaliação da inibição de óxido nítrico .....	38
3.6.1.2 Avaliação da inibição e indução das citocinas .....	38

3.6.1.3 Avaliação da produção do ânion superóxido.....	39
<b>3.6.2 Efeito da silimarina e da silibina sobre <i>H. pylori</i> na ativação de macrófagos.....</b>	<b>39</b>
3.6 AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO PELA SILIMARINA E SILIBINA .....	40
3.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE .....	41
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 ATIVIDADE ANTI- <i>H. pylori</i> .....	42
<b>4.1.1 Determinação da CIM e CBM.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.2 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.3 Avaliação <i>in silico</i> das interações da silibina com PBP2.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.4 Atividade sinérgica com o metronidazol.....</b>	<b>46</b>
4.2 ATIVIDADE SOBRE DA ENZIMA UREASE .....	46
4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MACRÓFAGOS MURINOS .....	47
4.4 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA .....	48
<b>4.4.1 Efeito do tratamento prévio do <i>H. pylori</i> com similarina e sibina na ativação de macrófagos .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2 Efeito das substâncias sobre macrófagos ativados com <i>H. pylori</i> .....</b>	<b>48</b>
4.4.2.1 Atividade inibitória sobre citocinas pró-inflamatórias.....	49
4.4.2.2 Atividade inibitória sobre o óxido nítrico .....	51
4.4.2.3 Atividade indutora sobre citocina anti-inflamatória .....	51
4.4.2.4 Atividade inibitória na produção de superóxido celular .....	53
4.5 AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DE NO .....	53
4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS).....	54
<b>4.6.1 Atividade citotóxica após ativação metabólica .....</b>	<b>55</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>75</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma importante ferramenta para tratamento de diversas doenças, configurando a fitoterapia como uma importante opção terapêutica na prevenção e tratamento de agravos de saúde, mesmo com o enorme avanço da indústria farmacêutica nos últimos anos (FERREIRA et al., 2014). O Ministério da Saúde, em 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), instituindo o desenvolvimento de políticas, programas e ações contemplando o uso de plantas medicinais e fitoterapia no SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Para fins de registro, fitoterápico é, por definição,

produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014a).

## 1.1 ESPÉCIE VEGETAL: *Silybum marianum*

Dentro os medicamentos registrados e comercializados no Brasil como fitoterápico encontra-se a espécie *Silybum marianum* (L.) Gaertn, sendo seu extrato aprovado para uso como medicamento hepatoprotetor e sem necessidade de prescrição médica (BRASIL, 2014b). A planta, conhecida popularmente como “cardo mariano”, é pertencente a família Asteraceae e é nativa do sul da Europa, sul da Rússia, Ásia Menor e norte da África (ABENAVOLI et al., 2010). É uma planta bianual, podendo alcançar 1,5 metro de altura, com folhas alternas, grandes, sinuado-denteadas e com espinhos (Figura 1). Possui flores róseas dispostas em capítulos terminais guarnecidos de brácteas também com espinhos (SIMÕES et al., 2007). Tem sido utilizado popularmente por mais de 2000 anos com fins medicinais para tratamento de doenças hepáticas, como cirrose e hepatite, além de ser utilizada como protetora para o fígado contra substâncias tóxicas (WIANOWSKA; WIŚNIEWSKI, 2015).

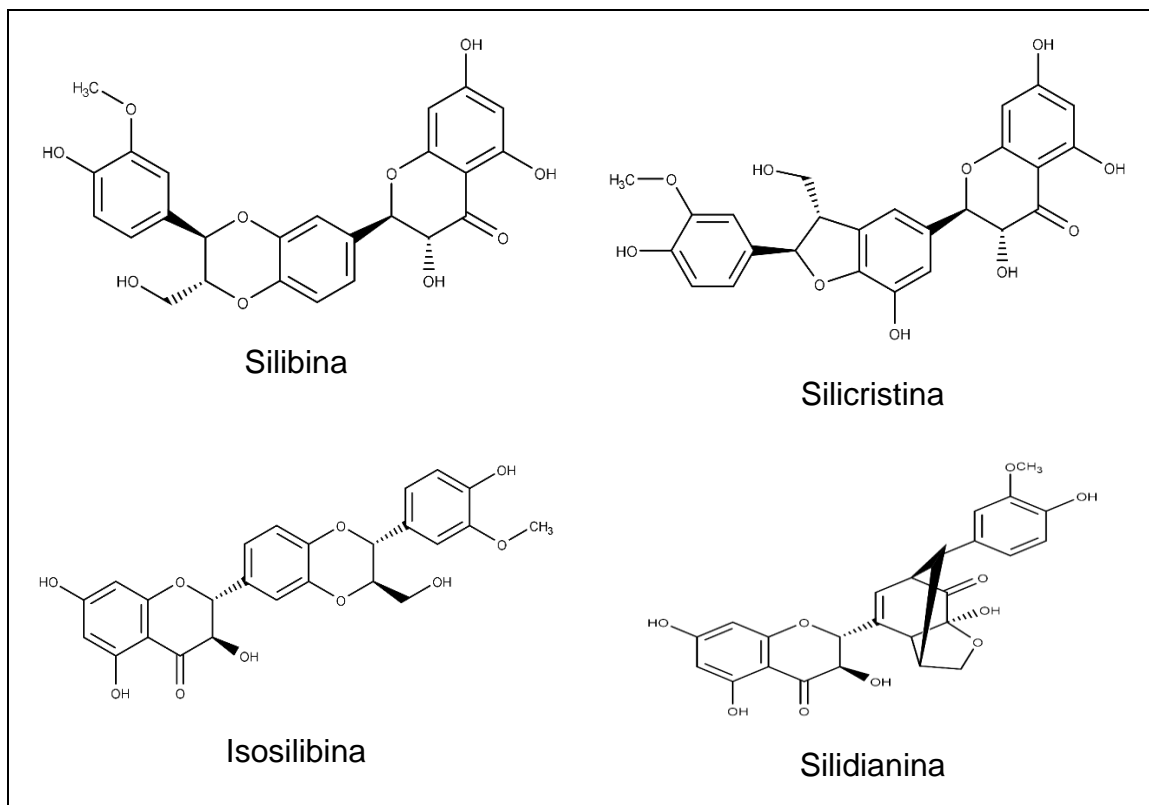
### 1.1.1 Composição química

A partir do extrato seco das sementes e dos frutos dessa planta, é possível extrair a silimarina, que constitui cerca de 70 a 80% de sua composição (ANDHALE, 2016; KVASNICKA et al., 2003). Esse processo de extração da silimarina envolve duas etapas, sendo a primeira um processo de retirada do excesso de lipídeos presentes no fruto com utilização de n-hexano e posteriormente o processo de extração é realizado por 5 horas com uso de metanol (WIANOWSKA; WIŚNIEWSKI, 2015). Além da silimarina, o cardo mariano ainda possui alguns componentes em menor quantidade, como mistura de compostos polifenólicos não definidos, ácidos linoleico, oléico e palmítico, esteróis, tocoferol e fosfolipídios (BIJAK, 2017).



**Figura 1** - Espécie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn. (retirado de BIJAK, 2017)

A silimarina é uma mistura complexa quimicamente constituída de uma combinação de flavolignanas, dentre as quais podemos destacar: silibina (A e B), isosilibina (A e B), silicristina, silidianina e outros (Figura 2) (KVASNICKA et al., 2003). A composição exata da silimarina pode variar dependendo de alguns fatores, como o tipo de processamento do extrato, condições climáticas, variedade da planta e composição do solo (ABENAVOLI et al., 2018). Apesar dessa variação, sabe-se que o componente majoritário da silimarina é a silibina, representando cerca de 50% de sua composição, em virtude disso, grande parte da atividade biológica da mistura é atribuída a essa molécula (BIJAK, 2017; CHAMBERS et al., 2017).



**Figura 2** - Estrutura química das principais flavolignanas que compõem a silimarina.

### 1.1.2 Propriedades farmacológicas

As flavolignanas presentes na silimarina já foram alvo de estudos sobre sua farmacocinética que demonstraram que em uma administração oral, essas substâncias são rapidamente absorvidas e eliminadas. Cerca de 20 a 50% da silimarina é absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo que 80% do que é absorvido é excretado pela bile e 10% sofre circulação entero-hepática. Com relação a silibina, sua biodisponibilidade é relativamente baixa, podendo ser influenciada por alguns fatores como por exemplo sua solubilidade na preparação. Após a absorção, as flavolignanas são metabolizadas e eliminadas na urina na forma de metabólitos conjugados com sulfato e ácido glicurônico (ABENAVOLI et al., 2018; CALANI et al., 2012; ZHU et al., 2013).

Estudos mostram que tanto cardo mariano, quanto a silimarina e a silibina possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladora, antifibrótica e hepatoprotetora, além de estimular síntese de proteínas e a regeneração do tecido hepático (ABENAVOLI et al., 2010). A silimarina vem

sendo utilizada por muito tempo em doenças hepáticas e tem demonstrado interferir na evolução da doença (DRYDEN; SONG; MCCLAIN, 2006; FLORA et al., 1998; KHAN et al., 2014). Essa função hepatoprotetora é devido algumas propriedades que a silimarina possui como seu efeito na diminuição da peroxidação lipídica e por aumentar o conteúdo de glutathione celular. Além disso, possui a capacidade de estabilizar a membrana regulando sua permeabilidade na presença de danos por xenobióticos, inibir a transformação de hepatócitos em miofibroblastos e a provável atuação no núcleo estimulando a síntese de proteína ribossômica (BAHMANI et al., 2015; FRASCHINI; DEMARTINI; ESPOSTI, 2002).

As propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da silimarina são explicadas por promover mecanismos como a inibição da liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, por exemplo o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) e 5-lipoxigenase. Ainda, a silimarina melhora a capacidade antioxidante das células promovendo a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o radical superóxido (O<sup>2•</sup>) e o ácido hipocloroso (HOCl) (ESMAEIL et al., 2017; SURAI, 2015). Estudos prévios demonstraram que a silimarina e a silibina estão envolvidas na supressão do fator de transcrição nuclear *kappa B* (NF- $\kappa$ B) induzida pelo TNF- $\alpha$ , regulando assim a expressão de genes que estão envolvidos nos processos de inflamação e carcinogênese (MANNA et al., 1999; RAINA; AGARWAL; AGARWAL, 2013).

Além disso, existem diversos estudos relacionando o possível uso da silimarina e silibina na terapêutica de câncer. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a capacidade anticancerígena em células de câncer de mama, pele, próstata, cervical, cólon, ovário, carcinoma hepatocelular, bexiga e pulmão. Nesse mesmo sentido, estudos clínicos vêm sendo desenvolvidos de modo a avaliar o potencial da silimarina em associação com outras drogas para alguns tipos de câncer, como, adenocarcinoma colorretal e próstata. Também vem sendo testadas para prevenir as possíveis toxicidades desencadeadas pelos tratamentos tradicionais (BAHMANI et al., 2015; RAMASAMY; AGARWAL, 2008). A silibina tem demonstrado ser um agente potencialmente anticancerígeno por promover a morte celular através de diversas vias, como apoptose, autofagia

e parada do ciclo celular, com uma certa seletividade para células cancerígenas. Além do seu uso isolado, tem sido estudada em associação com antineoplásicos de modo a tentar reverter resistência a terapia convencional (JAHANAFROOZ et al., 2018).

Podemos destacar também as propriedades gastroprotetoras da silimarina (SHIN et al., 2013). Estudos *in vivo* em modelos experimentais de indução de úlcera gástrica demonstraram que a silimarina, por melhorar a resposta antioxidante e anti-inflamatória, possui um efeito potencial gastroprotetor (ARAF KESHK et al., 2017; HUILGOL; JAMADAR, 2012). Estudos *in vitro* com linhagens de células derivadas de câncer gástrico, tanto adenocarcinoma (linhagens MGC-803, SNU-216 e SNU-668) quanto derivadas de metástase de outros órgãos (SGC 7901), sugerem que a silibina possui boa atividade anticancerígena (KIM et al., 2009; LI; YU; WANG, 2017; LU et al., 2017; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

A silimarina e silibina já são alvo também de diversos estudos clínicos. Atualmente existem cerca de 55 estudos clínicos registrados para a silimarina e 25 para a silibina. Uma gama variada de condições são arroladas nesses estudos, sendo apenas um voltado para o estudo do efeito da silimarina em associação com a cisplatina na prevenção de nefrotoxicidade em tratamento de adenocarcinoma gastrintestinal superior (NIH, 2019).

## 1.2 DOENÇAS GÁSTRICAS

As úlceras e gastrites merecem destaque, dentre as doenças relacionadas ao estômago, por serem doenças comuns que podem levar a condições de cronicidade, que em alguns casos podem evoluir para o câncer. O desenvolvimento dessas condições é multifatorial, sendo ocasionado pelo desequilíbrio nos mecanismos protetores da mucosa gástrica. Tabagismo, consumo de álcool, fatores psicológicos, uso abusivo de anti-inflamatórios não esteroidais, declínio nos níveis de prostaglandina e, principalmente, a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, são elementos que contribuem para a sua

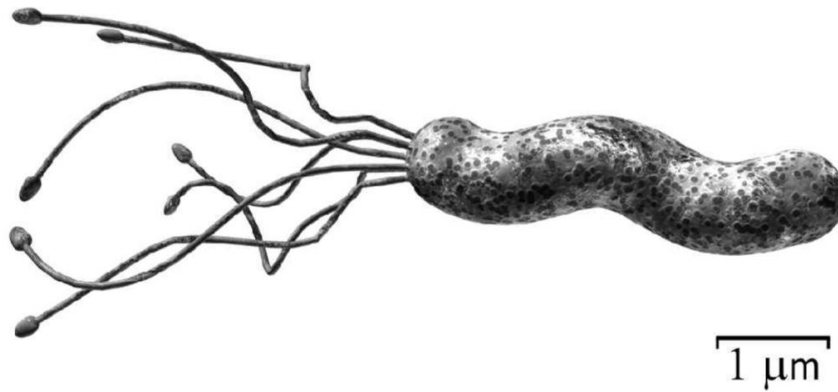
evolução (GRAHAM, 2014; SIPPONEN; MAAROOS, 2015; YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

Dados epidemiológicos mostram que cerca de 50% da população mundial é afetada por *H. pylori*, sendo de maior prevalência em países em desenvolvimento (SJOMINA et al., 2018). Na América Latina e Caribe a prevalência é aproximadamente 60%, enquanto no Brasil, estima-se que a infecção pode atingir aproximadamente 82% dos adultos (CURADO; OLIVEIRA; FAGUNDES, 2019; HUNT et al., 2011). Apesar da alta prevalência grande parte desses pacientes são assintomáticos. Contudo, a presença crônica dessa bactéria no estômago está associada ao desenvolvimento de úlceras e gastrites, podendo levar, cronicamente, ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

A procura de compostos a partir de fontes naturais como alternativa ao tratamento padrão com antimicrobianos pode ser promissor, visto que o controle do micro-organismo tem se tornado um desafio em virtude das altas taxas de resistência a terapia (FAKHERI et al., 2014; MASCELLINO et al., 2017). Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos a fim de avaliar o potencial antibacteriano de substâncias, tanto no sentido de buscar novas alternativas como no seu uso combinado com os tradicionais antimicrobianos usados no tratamento da infecção em busca de melhora da eficácia do tratamento padrão da infecção (ABU-SINI et al., 2017; AIBA et al., 2017; BALTAS et al., 2016; HASSAN et al., 2016; ZENGIN et al., 2018).

### **1.2.1 *Helicobacter pylori***

*H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, bacilar, com forma espiralada, microaerófila, podendo apresentar de 4 a 6 flagelos (Figura 3). Foi isolada pela primeira vez, em 1982, por Marshall e Warren a partir de espécimes de biopsia obtidos por gastroscopia, onde foram observados micro-organismos gram-negativos, flagelados e microaerófilos em praticamente todos os pacientes com gastrite crônica ativa, úlcera duodenal ou úlcera gástrica (DUNN; COHEN; BLASER, 1997; MARSHALL; WARREN, 1984).



**Figura 3** – *Helicobacter pylori* em imagem 3D (MARSHALL, 2002).

A mucosa gástrica contém células epiteliais capazes de secretar muco e fluido alcalino, conferindo, por exemplo, proteção contra lesões mecânicas. Além disso, glândulas secretoras presentes no fundo e corpo do estômago são responsáveis pela secreção ácida que em conjunto com o muco conferem uma barreira a colonização bacteriana no órgão. Mesmo diante dessas barreiras, a bactéria é capaz de tornar esse ambiente inóspito em seu local de colonização. Isso só se torna possível, porque a *H. pylori* é altamente adaptável ao ambiente estomacal em virtude de um conjunto de características que permitem a sua entrada e movimentação no muco, adesão às células epiteliais gástricas e subterfúgio da resposta imune do hospedeiro. Isso garante uma colonização e transmissão persistente da bactéria no estômago (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; YAO; SMOLKA, 2019).

A produção da enzima urease também é um dos mecanismos que permitem a bactéria contornar a acidez do estômago. A enzima é responsável por realizar a hidrólise de ureia (produto endógeno do catabolismo de proteínas e aminoácidos) em dióxido de carbono e amônia, permitindo o aumento do pH estomacal necessário para a sobrevivência inicial do micro-organismo. Além disso, os flagelos permitem a sua motilidade de modo a atravessar o muco e aderir as células epiteliais gástricas. A adesão às células epiteliais é possível em virtude da presença de componentes de superfícies, como por exemplo a adesina *BabA* (ABADI, 2017).

A bactéria possui em sua superfície externa da membrana um conjunto de enzimas responsáveis pela biossíntese de peptidoglicano, componente

importante da parede celular bacteriana. Essas enzimas, denominadas de *Penicilin binding protein* (PBP), estão presentes em praticamente todas as bactérias, sendo relatadas três tipos de alto peso molecular (PBP1, PBP2 e PBP3) e são o alvo dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (FRANCESCO et al., 2011).

Outros fatores de virulência importantes são a proteína codificada pelo gene *cagA*, a citotoxina vacuolante e a proteína ativadora de neutrófilos (HP-NAP). A *cagA* é codificada na ilha de patogenicidade *cag* PAI, que também é responsável pela codificação de um sistema de secreção do tipo IV. Esse sistema irá injetar a *cagA* e outras proteínas nas células epiteliais gástricas que irão desencadear uma atividade oncogênica. A citotoxina vacuolante é codificada pelo gene *vacA*. Essa toxina é responsável por formar canais de membrana, promover a liberação de citocromo C das mitocôndrias que irá levar a apoptose, iniciar a resposta pró-inflamatória, inibir a ativação de células T e induzir vacuolização citoplasmática (YAMAOKA; GRAHAM, 2014). A HP-NAP atua nos neutrófilos promovendo o estímulo a produção de ERO e adesão dessas células às endoteliais. Além disso, induz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como as interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (EVANS et al., 1995; WANG et al., 2008).

Na maioria dos pacientes, a colonização por *H. pylori* persiste por muito tempo em virtude uma vigorosa adaptação as respostas imunológicas inata e adaptativa. A presença da bactéria no estômago causa um recrutamento intenso de células fagocitárias, como os macrófagos e neutrófilos, no intuito de tentar cessar a infecção. Um dos mecanismos utilizados para isso é a intensa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Além disso, ocorre uma intensa expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com consequente produção de óxido nítrico (NO) (ABADI, 2017; BUTCHER et al., 2017).

O NO é uma molécula importante na homeostase e em processos patogênicos. A indução de NO pelo aumento da expressão de iNOS está fortemente associado com a injúria da mucosa gástrica, sendo demonstrado que em tecidos gástricos infectados com *H. pylori* a expressão da enzima é maior que em tecidos não infectados. Por exemplo, seu aumento produz um efeito

citotóxico com formação de 8-nitroguanina, que é tóxica para as células, pode contribuir, inclusive, no processo de carcinogênese. Dessa forma, substâncias que possam reduzir os níveis teciduais de NO, são importantes na intensa lesão tecidual causada pela infecção por *H. pylori* (FU et al., 1999; GOBERT; WILSON, 2016; MANNICK et al., 1996).

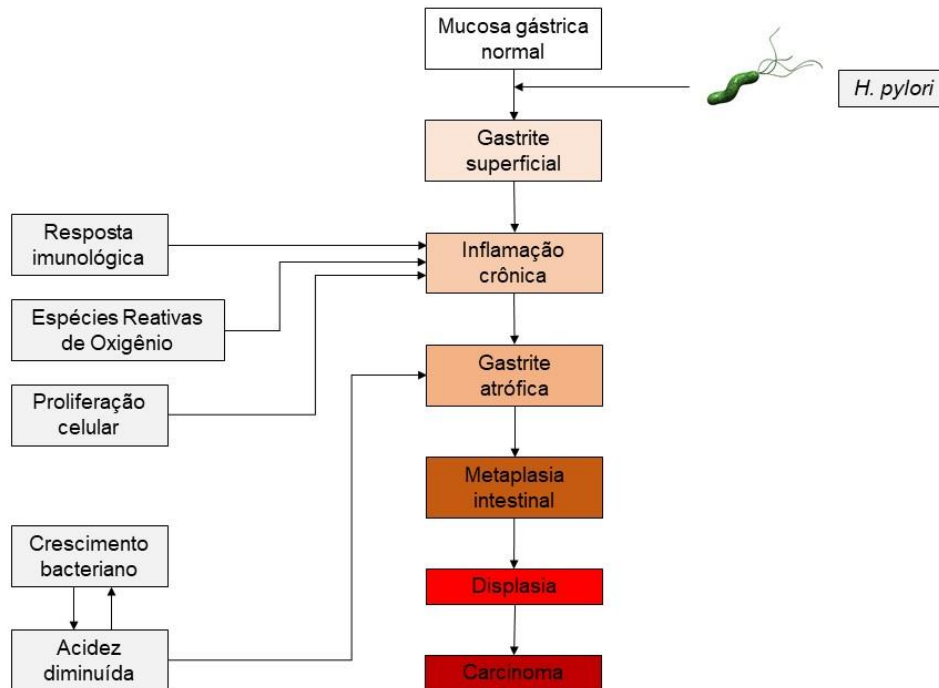
A migração de neutrófilos com síntese de ERO é característica marcante da resposta imunológica inata. Uma das espécies formadas é o ânion superóxido, resultado da catálise de oxigênio pela NADPH oxidase. Esse ânion formado é gerado no meio extracelular e é altamente danoso para o tecido por sua grande capacidade reativa.

Durante a infecção por *H. pylori* é produzida uma resposta inflamatória na mucosa gástrica mediada por citocinas produzidas pelas células epiteliais. Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-8, são observadas em níveis elevados na mucosa gástrica de paciente em infecção por *H. pylori*. Enquanto citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10), estão presentes em menor quantidade e são associadas com o aumento da inflamação (RAMIS et al., 2017).

Geralmente esse microambiente inflamatório criado pela infecção é responsável pelo combate a outros patógenos. Entretanto, na infecção por *H. pylori* essa inflamação é persistente e soma-se a isso, os danos oxidativos causados com consequente dano ao DNA celular. As células infectadas possuem também deficiência nos mecanismos de reparo ao DNA e essa falha pode induzir quebra das fitas levando a erros de replicação. Nessa forma, a infecção evolui para um adenoma e posteriormente para um carcinoma. No carcinoma, o processo inflamatório (BUTCHER et al., 2017; MA; LIU; LIANG, 2016). A Figura 4 representa os principais fatores envolvidos na infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento da carcinogênese gástrica.

As infecções crônicas por *H. pylori* são associadas ao desenvolvimento de diversas do doenças do trato gastrintestinal, podendo destacar as úlceras gástricas, câncer gástrico, linfoma do tecido linfoide associado a mucosa (MALT) e câncer do trato biliar (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

Em 1994, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a *H. pylori* como carcinógeno do tipo 1 para o desenvolvimento de câncer gástrico. Dessa forma, a presença da bactéria é considerada fator de risco para a incidência de câncer gástrico sendo a sua erradicação imprescindível na prevenção no desenvolvimento desse tipo de neoplasia (BAE et al., 2018; WHO, 1994).



**Figura 4** - Fatores envolvidos na infecção por *H. pylori* que levam a carcinogênese (WROBLEWSKI; PEEK; WILSON, 2010).

No mundo, o câncer gástrico é a quinta neoplasia mais comum e o terceiro que mais causa mortes por essa doença (BRAY et al., 2018). Apresenta-se em três formas histológicas: adenocarcinoma (95% dos tumores), linfoma e leiomiossarcoma, sendo o primeiro o mais associado a infecção por *H. pylori* (DOORAKKERS et al., 2018). Sua incidência é maior em homens por volta dos 70 anos. A estimativa de novos casos para 2018 no Brasil é de 21.290, sendo 13.540 em homens e 7.750 em mulheres. Em 2013, foram registradas 14.182 mortes em decorrência dessa neoplasia. O tratamento cirúrgico, com a retirada total ou parcial, é a principal alternativa para a cura do câncer gástrico. Contudo,

a radioterapia e quimioterapia adjuvantes podem determinar uma melhor resposta a cirurgia (INCA, 2018).

Apesar de *H. pylori* estar bastante relacionada aos danos do sistema gastrointestinal, é conhecido que importantes alterações extra gástricas possam ser causadas pela infecção. Condições como a trombocitopenia púrpura idiopática, anemia por deficiência de ferro e deficiência de vitamina B12 possuem sua relação bem estabelecida com a infecção. Contudo, ainda existe o interesse em estudos que possam correlacionar *H. pylori* com condições cardiovasculares, neurológicas, dermatológicas, obstétricas imunológicas e metabólicas (GONI; FRANCESCHI, 2016).

#### 1.2.1.1. Tratamento

O tratamento de primeira escolha para a infecção por *H. pylori* consiste em uma terapia padrão com a combinação de três medicamentos, sendo eles, um inibidor de bomba de próton associado aos antibióticos amoxicilina e claritromicina por um período entre 10 a 14 dias. Contudo, a resistência a terapia padrão usualmente recomendada ainda tem se mostrado uma barreira no tratamento da infecção e é possível utilizar-se de outros esquemas terapêuticos para o tratamento da infecção conforme demonstrado na Tabela 1 (COELHO et al., 2018; MALFERTHEINER et al., 2017; O'MORAIN et al., 2018).

Além da barreira da resistência bacteriana, a dificuldade de adesão ao tratamento também tem se tornado um desafio na erradicação da bactéria. Os regimes terapêuticos propostos, como anteriormente descritos, são complexos, com alta incidência de reações adversas e, muitas vezes, economicamente inacessíveis para muitos pacientes (LI et al., 2018). Em virtude das dificuldades encontradas no controle da infecção, em 2017 a OMS destacou a *H. pylori* (claritromicina resistente) como um dos agentes infecciosos de alta prioridade para desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

Vários estudos têm documentado o uso de derivados de produtos naturais com atividade antimicrobiana contra *H. pylori* (BONIFÁCIO et al., 2014a; REZAEIMANESH et al., 2017). Podemos destacar os resultados obtidos com *Impatiens balsamina* L., uma planta medicinal do Taiwan, no qual seus extratos

em acetona e acetato de etila demonstraram possuir uma forte atividade antimicrobiana *in vitro* (WANG et al., 2009) e de plantas utilizadas na medicina tradicional mexicana como, *Persea americana*, *Annona cherimola*, *Guaiacum coulteri* e *Moussonia deppeana*, onde seus extratos metanólicos também obtiveram forte atividade anti- *H. pylori* (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2009).

**Tabela 1** - Tratamentos de primeira linha para a infecção com *H. pylori* segundo o Consenso Brasileiro de Infecção por *Helicobacter pylori*. (Adaptado COELHO et al., 2018)

<b>Tratamentos de primeira linha</b>	
Terapia tripla padrão	Inibidor da bomba de próton Claritromicina Amoxicilina
Terapia quadrupla com bismuto	Inibidor da bomba de próton Subcitrato de bismuto coloidal Tetraciclina ou Doxiciclina Metronidazol
Terapia concomitante sem bismuto	Inibidor da bomba de próton Claritromicina Amoxicilina Metronidazol ou Tinidazol

Apesar de existirem vários estudos demonstrando a atividade de produtos naturais frente *H. pylori*, pouco conseguem demonstrar o mecanismo de ação envolvido. Dentre alguns mecanismos descritos na literatura, pode-se destacar a inibição da atividade da urease, atividade de inibição da adesão, dano ao DNA, inibição da síntese proteica e estresse oxidativo (WANG, 2014). Diante dessas inúmeras possibilidades de ação, produtos naturais tem demonstrado possuir potencial efeito sinérgico ou aditivo contra *H. pylori* em associação com outras substâncias (YANG; LU; LIN, 2014).

Nesse contexto, a silimarina e a silibina são o objeto de estudo desse trabalho. Considerando que no Brasil a silimarina é registrada e comercializada para fins hepatoprotetores, sendo de relativo baixo custo de aquisição. Além

disso, os estudos apontam para um potencial efeito gastroprotetor dessas substâncias. Somando-se isso ao crescente interesse no conhecimento dos efeitos dos produtos fitoterápicos, tornando importante a pesquisa de suas atividades biológicas. Dessa forma, torna-se interessante o estudo dessas substâncias no contexto da infecção por *H. pylori* e no câncer gástrico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar os efeitos da silimarina e silibina sobre *Helicobacter pylori*, bem como, suas atividades imunomoduladora em macrófagos e citotóxica sobre linhagem tumoral gástrica.

### 2.2. ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade antimicrobiana da silimarina e silibina frente ao micro-organismo *H. pylori*;
2. Avaliar o sinergismo da atividade antimicrobiana da silimarina e silibina sobre *H. pylori* associado ao metronidazol;
3. Avaliar o efeito da silimarina e silibina sobre a estrutura de *H. pylori* através da análise por microscopia eletrônica de varredura;
4. Avaliar *in silico* a interação da silibina com PBP
5. Avaliar a inibição da enzima urease *in vitro*;
6. Avaliar a atividade imunomoduladora da silimarina e silibina sobre macrófagos ativados por meio de ensaios de:
  - a. Inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, óxido nítrico, ânion superóxido;
  - b. Indução da produção de IL-10;
7. Avaliar a atividade de captura de NO pela silimarina e silibina;
8. Avaliar o efeito citotóxico e de seletividade da silimarina e silibina sobre a linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano antes e após a submissão ao sistema de metabolização.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA SILIMARINA E SILIBINA

As substâncias do presente estudo, silimarina (SIGMA cod. S0292; St. Louis, MO, USA) e silibina (SIGMA cod. S0417; St. Louis, MO, USA), com os respectivos lotes BCBT9170 e BCBS2989V, foram obtidas comercialmente. O certificado de análise da silimarina, por cromatografia líquida de alta eficiência, demonstra um teor de 38,2% de silibina. As soluções de estoque foram preparadas a 10mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO).

#### 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*H. pylori*

##### 3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A técnica de microdiluição em placa foi utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), conforme estabelecido pela *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (M7-A10, 2015) com modificações (CLSI, 2015, 2017).

Os ensaios foram realizados com as cepas de *H. pylori* ATCC 43504 (amoxicilina sensível e metronidazol resistente) e ATCC 43629 (amoxicilina e metronidazol sensível). Cada cepa foi inicialmente cultivada em placas contendo Agar Columbia suplementado com 5% v/v de sangue de carneiro com incubação por 72 horas em condições de anaerobiose (37°C/10% CO<sub>2</sub>). Após o período de crescimento, as colônias foram repicadas para caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Merck Millipore cod. 110493, Darmstadt, Alemanha) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SIGMA cod. F2561; St. Louis, MO, USA), e incubadas sob as mesmas condições.

O ensaio de CIM foi realizado em microplaca de 96 orifícios. A suspensão bacteriana utilizada no ensaio foi preparada a partir de uma diluição 1:20 da escala de 0,5 MacFarland em BHI suplementado, equivalente a 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bactérias/mL. Assim, a cada poço foram adicionados 100 µL das amostras, em diferentes concentrações variando entre 16 e 1024 µg/mL, e 100 µL da

suspensão bacteriana. Os controles foram realizados por meio de adição de suspensão bacteriana (controle positivo) ou das amostras (controle negativo) em meio BHI suplementado.

As leituras de absorvância foram realizadas antes e após incubação por 72 horas a 37°C/10% CO<sub>2</sub> em 620nm. A inibição do crescimento foi calculada por meio da diferença das leituras comparadas ao controle positivo de crescimento. A CIM foi definida como sendo a menor concentração onde foi induzido o declínio da absorvância correspondente a 90% de inibição.

Os padrões para controle de atividade anti-*H. pylori* utilizados para os ensaios foram os antibióticos amoxicilina (SIGMA cod. A8523; St. Louis, MO, USA) e metronidazol (SIGMA cod. M3761; St. Louis, MO, USA), nas concentrações variando de 0,016 – 5 µg/mL e 16 - 512 µg/mL, respectivamente.

### **3.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)**

A concentração bactericida mínima (CBM) foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir a formação de colônias em placas de Agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% v/v. Neste ensaio foram selecionadas as concentrações do ensaio de determinação de CIM onde não houve crescimento bacteriano aparente. Estas concentrações foram inoculadas no meio indicado acima e incubadas a 37°C/CO<sub>2</sub> 10% por 72h.

### **3.2.3 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura**

As análises microscópicas foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação das alterações morfológicas foi realizada a partir das concentrações sub-inibitórias (1/2 CIM) da silimarina e silibina. Como padrão de tratamento foi utilizado a amoxicilina, além do controle positivo de crescimento (sem tratamento).

A metodologia utilizada foi adaptada de Chakraborti et al., (2013) e Fischer et al., (2013).

A bactéria foi incubada com as concentrações sub-inibitórias de silimarina e silibina, com o padrão amoxicilina e sem tratamento (controle positivo). Após esse período, foram aliqüotadas e submetidas a centrifugação (800 rpm por 15 minutos). Procedeu a retirada do sobrenadante, sendo adicionado tampão cacodilato 0,1M acrescido de glutaraldeído 2,5% v/v aos *pellets* celulares para fixação das células. Os *pellets* foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente overnight a 2 – 4°C. Após incubação foi realizada a lavagem com tampão cacodilato 0,1M por 3 vezes durante 10 minutos cada.

As amostras foram submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% p/v em cacodilato 0,1M adicionado de ferrocianeto de potássio 1,25% p/v, sendo incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, foi realizada uma lavagem em tampão cacodilato 0,1M e duas lavagens em água ultrapura cada uma de 10 minutos.

Posteriormente, procedeu-se a desidratação gradual com banhos de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100% v/v por 10 minutos cada à temperatura ambiente e secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Tousimis Autosamdri® 815 Series A, USA).

Após secagem, o material foi metalizado (Desk V, Denton Vacuum) e submetido a visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL®, JSM-6610LV (Tóquio, JAPÃO), com uma tensão de aceleração de 20 kV e filamento de tungstênio.

#### **3.2.4 Avaliação *in silico* das interações com PBP**

O estudo das interações foi feito com o programa GOLD 5.5 por meio de cálculos de *docking* realizados com o complexo cristalográfico da proteína PBP (código PDB: 5LP4) depositado no banco de dados de *Protein Data Bank* (PDB), selecionando a função de escore *goldscore* em uma esfera de raio 10 Å ao redor do ligante cristalográfico. O modelo gerado foi validado por *redocking* e

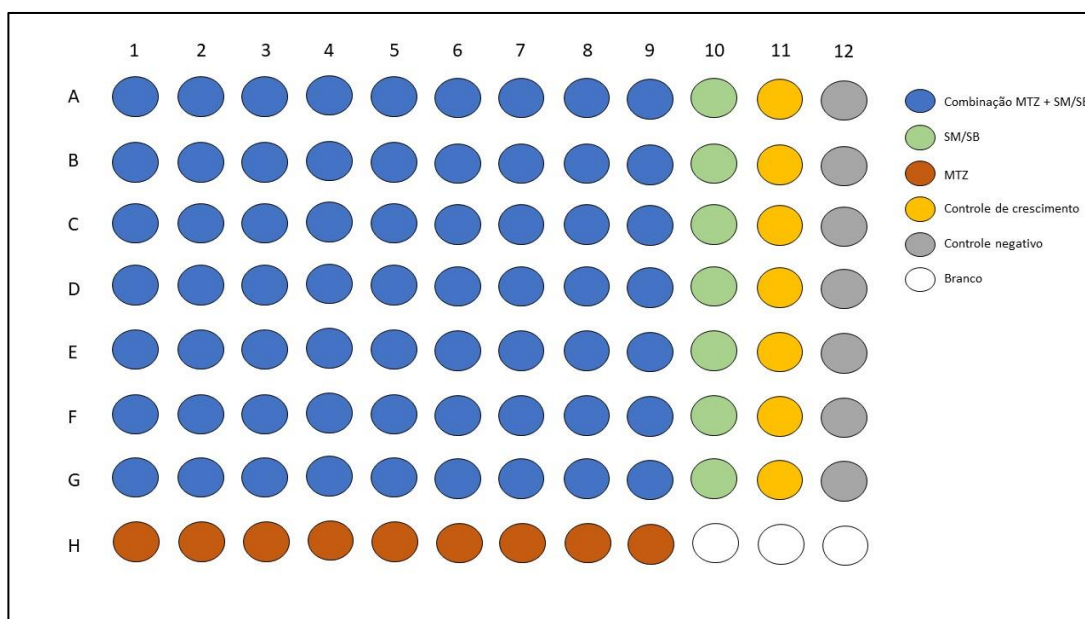
*crossdocking* utilizando o ligante cristalográfico biapenem do complexo cristalográfico (JONES et al., 1997; VERDONK et al., 2003).

O processo de *redocking* consiste em retirar o ligante cristalográfico do arquivo contendo o complexo proteína-ligante e efetuando, via cálculo o *docking* deste ligante cristalográfico novamente em seu sítio ativo. A diferença na pose calculada pelo programa de *docking* e da conformação bioativa é então calculada pelo desvio médio quadrático (RMSD - *root mean square deviation*). Já o *cross-docking* testará a capacidade do programa de *docking* de resolver o cálculo em complexo cristalográfico semelhante, verificando então, a confiabilidade do programa em encontrar a solução correta.

### **3.2.5 Avaliação do sinergismo da silimarina e silibina com o metronidazol sobre *H. pylori***

A avaliação do sinergismo da silimarina e da silibina com o metronidazol foi realizada pela técnica de *checkerboard* (PILLAI; MOELLERINH JR.; ELIOPOULOS, 2005). Esse método propõe a diluição de antimicrobianos distribuídos em uma microplaca como se fosse um tabuleiro de xadrez.

A técnica utiliza o mesmo princípio da microdiluição em caldo conforme descrito no item 3.2.1. Foram preparadas diluições seriadas em caldo BHI da silimarina e da silibina para serem combinadas com a diluição do metronidazol. Foram testadas as concentrações de silimarina e silibina a partir do CIM de cada uma. Para silimarina foram utilizadas as concentrações de 16 a 1024 µg/mL, para silibina de 4 a 256 µg/mL e para o metronidazol 2 a 512 µg/mL. A silimarina e a silibina foram adicionadas nas linhas de A a G, sendo uma concentração para cada linha, exceto na coluna do controle positivo. O metronidazol foi adicionado nas colunas 1 a 9, sendo uma concentração para cada coluna. Os ensaios sempre foram acompanhados de um controle de crescimento bacteriano na coluna 11 e controle negativo na coluna 12 (Figura 5).



**Figura 5** - Representação esquemática para avaliação do efeito sinérgico pelo método de *checkerboard*.  
 Legenda: MTZ – metronidazol; SM – silimarina; SB – silibina.

As interações entre os tratamentos foram calculadas pelo índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), que consiste na soma da concentração inibitória fracionada (CIF) de cada tratamento. O CIF é determinado pela soma da razão entre CIM obtido na combinação e o CIM do tratamento.

De acordo com o ICIF a interação é classificada de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2** - Valores de ICIF para cada tipo de interação

Interação	ICIF
Sinergismo	$\leq 0,5$
Aditivo	0,5 – 1,0
Indiferente	1,0 – 2,0
Antagonismo	$>2$

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE A ENZIMA UREASE

O ensaio de avaliação da atividade de inibição da urease foi realizado através de metodologia já descrita em literatura com modificações (TANAKA; KAWASE; TANI, 2004), na qual é quantificada a produção de amônia a partir da ureia na reação catalisada pela urease. A enzima urease (4U) (Jack Bean urease, Sigma cod. U1500; St. Louis, MO, USA) dissolvida em tampão PBS (100mM e pH 6,8) foi adicionada em microplaca. O mesmo volume da silimarina e silibina foi adicionado em diferentes concentrações (32 a 1024 µg/mL) e procedeu a incubação da microplaca por 2 horas a 37°C. Posterior a incubação, foram adicionados 200 µL de uréia (100 mM) e 25 µL de vermelho de fenol com concentração final de 0,002% p/v.

A leitura de absorção foi realizada em 540nm, sendo avaliada a cinética da reação do tempo 0 a 30 minutos a cada 10 minutos. O pico de atividade foi determinado no tempo de 20 minutos.

### 3.4 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

#### 3.4.1 Macrófagos murinos (RAW 264.7)

A linhagem celular de macrófagos utilizada foram macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB 71™), provenientes do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ Cod. 0212) e cedidas pelo Professor Doutor Marcio Fronza/Universidade Vila Velha.

As culturas celulares foram mantidas em garrafas de plástico estéreis em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Vitrocell cod. 02037, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em estufa a 37° C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Ao apresentarem confluência (70 a 90%), após aproximadamente de 3 a 4 dias, as células foram removidas do tapete com *cell scraper*. Após a remoção do tapete celular era feita a determinação concentração celular para manutenção das culturas e para a realização dos ensaios.

### **3.4.2 Adenocarcinoma gástrico (AGS)**

A linhagem de cultura celular de adenocarcinoma gástrico humano (ATCC CRL - 1739) utilizada foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ Cod. 0311).

As culturas celulares foram mantidas em garrafas de plástico estéreis em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Vitrocell cod. 02037, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em estufa a 37° C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Ao apresentarem confluência (70 a 90%), após aproximadamente de 3 dias, as células foram removidas do tapete pelo processo de tripsinização, com 2 mL de solução de tripsina 0,2% v/v + Versene 0,02% v/v, (Instituto Adolfo Lutz). Após a remoção do tapete celular era feita a determinação concentração celular para manutenção das culturas e para a realização dos ensaios.

## **3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através da metodologia do MTT-tetrazólio (MOSMANN, 1983), com o objetivo de determinar as concentrações das substâncias que poderiam ser utilizadas nos ensaios celulares posteriores com macrófagos e verificar qual o potencial antitumoral nas células de AGS.

### **3.5.1 Macrófagos murinos (RAW 264.7)**

Uma suspensão de macrófagos em DMEM suplementado na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL foi adicionada em cada poço da microplaca de 96 orifícios e incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingir confluência (70 a 90%), o meio foi descartado e adicionadas diferentes concentrações (6,25 a 200µg/mL) das substâncias teste preparadas em DMEM suplementado. O controle de crescimento foi realizado com adição de apenas DMEM suplementado.

Posteriormente as microplacas foram incubadas com os tratamentos por 24 horas nas mesmas condições anteriores. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e adicionado a solução de MTT-tetrazólio a 1mg/mL (SIGMA cod. M2128; St. Louis, MO, USA) em DMEM não suplementado e incubado novamente nas mesmas condições por 3 horas.

Após o período de incubação o sobrenadante foi desprezado e 200 µL de DMSO foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazan formados pelas células viáveis. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 540 nm com filtro de referência em 620nm. Os experimentos foram acompanhados de crescimento controle sem tratamento (sem substância). O percentual de células viáveis foi calculado em relação a esse controle de crescimento.

### **3.5.2 Adenocarcinoma gástrico (AGS)**

A avaliação da citotoxicidade foi realizado por meio do preparo de uma suspensão celular com concentração de  $6 \times 10^4$  células/mL. Essa suspensão foi distribuída em microplacas de 96 orifícios e incubada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Posterior a incubação por 24 horas, foi descartado o meio e adicionadas diferentes concentrações das substâncias silibina, silimarina e do quimioterápico padrão (Cisplatina) nas concentrações de 1,56 a 50 µg/mL. A microplaca foi novamente incubada por 48 e 72 horas nas mesmas condições descritas. Em seguida, a avaliação da toxicidade na linhagem celular foi realizada pela técnica de MTT-tetrazólio, conforme descrito anteriormente no item 3.5.1 (MOSMANN, 1983).

#### **3.5.2.1 Citotoxicidade em adenocarcinoma gástrico (AGS) associada a um sistema de metabolização**

Para a avaliação da citotoxicidade associada a um sistema de metabolização foi prepara a microplaca seguindo o mesmo procedimento do item

3.5.2. Os tratamentos foram realizados com a silimarina e a silibina nas mesmas concentrações do item anterior. A ciclofosfamida foi utilizada como padrão de ativação metabólica com as mesmas concentrações dos tratamentos. Aos tratamentos foram adicionados 10% v/v de um sistema de metabolização exógeno.

Esse sistema de metabolização exógeno consiste em um preparado constituído de 10% v/v de fração S9 de fígado de rato (Sigma cod.: S2067-1VL, St. Louis, MO, USA), acrescido de 29,5% v/v de água destilada estéril, 54% v/v de tampão fosfato 0,2M (81% v/v de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 19% v/v de fosfato de sódio monobásico 0,2 M), 0,5% v/v de solução de D-glicose-6-fosfato 1M, 4% v/v de solução de  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, 1% v/v de cloreto de potássio 1,65M e 1% v/v de cloreto de magnésio 0,4M.

Após a incubação por 48 e 72h, os tratamentos foram aspirados e descartados e as células aderentes submetidas a técnica de MTT-tetrázolio, conforme descrito anteriormente no item 3.5.1 (MOSMANN, 1983).

Cada experimento foi realizado em triplicata para cada substância testada e o percentual de células viáveis foi calculada em relação ao controle de crescimento sem tratamento (sem substância).

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

#### 3.6.1 Efeito da silimarina e da silibina sobre a ativação de macrófagos

Para realização dos testes, as células foram distribuídas em placas de 96 orifícios na concentração aproximada de  $10^6$  macrófagos/mL, para os ensaios com IL-6 e IL-10 e  $10^5$  macrófagos/mL para os ensaios com NO e TNF- $\alpha$ , em meio DMEM suplementado.

Nos ensaios de NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, após 2-3h de incubação (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) para adesão celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas com suspensão de *H. pylori* (UDO<sub>620nm</sub> = 0,08 a 0,09) em

DMEM suplementado, recebendo, ao mesmo tempo, concentrações da silimarina e silibina entre 1,56 a 50 µg/mL (concentrações não citotóxicas).

Para o ensaio de IL-10 também foi realizado o ensaio com as células não estimuladas, as mesmas foram apenas tratadas com a silimarina e silibina, nas mesmas concentrações acima citadas. As placas foram incubadas por 24 horas (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C). Posteriormente, a microplaca foi centrifugada à 4000 rpm por 10 minutos para a coleta dos sobrenadantes.

#### 3.6.1.1 Avaliação da inibição de óxido nítrico

Os sobrenadantes dos tratamentos dos itens 3.6.1 e 3.6.2 foram submetidos a detecção e quantificação do óxido nítrico pelo método de Griess.

O método de Griess consiste na análise de nitrito, por meio da adição de mistura reagente composta de 1%p/v de sulfanilamida, 0,1%p/v N-naftiletilenodiamina em 2,5%v/v de ácido ortofosfórico. O nitrito, produto da degradação do NO, reage sob condições ácidas (ácido ortofosfórico) formando um sal diazônio, que irá se acoplar a amina aromática N-naftiletilenodiamina produzindo uma coloração rósea que pode ser quantificada pela leitura da absorbância (GIUSTARINI et al., 2008).

O ensaio foi realizado adicionando 50 µL do sobrenadantes coletado e 50 µL do reagente de Griess em microplaca e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a reação, foi procedida a leitura em 540 nm em leitor de microplacas iMark™ Bio-Rad (Washington, USA). Os dados dos ensaios foram calculados com auxílio de curva padrão de NO em concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mM) (Anexo).

#### 3.6.1.2 Avaliação da inibição e indução das citocinas

Os sobrenadantes das culturas obtidas nos tratamentos 3.6.1 e 3.6.2 foram coletados para a detecção e quantificação das citocinas (TNF-α, IL-10 e IL-6) pelo método imunoenzimático utilizando os kits Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! (Cód. 88-7324-88), Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go! (Cód.88-7105-88) e Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go! (Cód. 88-7064-88)

(eBioscience, San Diego, CA, USA). Os dados dos ensaios foram calculados com auxílio de curva padrão em concentração de citocina purificado em pg/mL (Anexo).

### 3.6.1.3 Avaliação da produção do ânion superóxido

Para avaliar o efeito inibitório sobre a produção de superóxido em macrófagos, as células foram distribuídas em placas de 96 orifícios na concentração aproximada de  $8 \times 10^4$  macrófagos/mL em meio DMEM completo. Após 24h de incubação (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) para adesão celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram estimuladas com uma suspensão de *H. pylori* em DMEM suplementado, recebendo, ao mesmo tempo, diferentes concentrações das substâncias de 1,56 a 50 µg/mL. Foram realizados os controles de produção de superóxido nos macrófagos com e sem estímulo.

As placas foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Posteriormente, os sobrenadantes foram removidos novamente e adicionada a placa uma solução de NBT (*nitrotetrazolium blue chloride*) (1 mg/mL) e incubadas por 2h. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e metanol e incubadas a 37°C para secar por aproximadamente 20 minutos. Os cristais de formazan foram solubilizados com 120 µL hidróxido de potássio (KOH) 2M durante 5 minutos e posteriormente 140 µL de DMSO por mais 5 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 620 nm (CHOI et al., 2006).

### 3.6.2 Efeito da silimarina e da silibina sobre *H. pylori* na ativação de macrófagos

As concentrações sub-inibitórias das substâncias foram utilizadas para determinar a influência nas estruturas fundamentais da *H. pylori* comparada ao efeito na bactéria sem tratamento. Para isso foi avaliado a capacidade de ativar cultura de macrófagos e induzir a produção de NO, TNF-  $\alpha$  e IL-6.

*H. pylori* foi cultivada na presença de concentrações subinibitórias de silimarina (512µg/mL) e silibina (128µg/mL), conforme descrito no item 3.2.1. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos, para a retirada do

sobrenadante, sendo o *pellet* formado, lavado 3 vezes com PBS estéril para total remoção das substâncias. Após a lavagem foi preparado um inóculo com concentração determinada por densidade óptica (UDO<sub>620</sub> 0,20).

A suspensão de macrófagos contendo 10<sup>5</sup> células/mL, preparada em meio DMEM suplementado, foi incubada para aderência celular a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Após confluência, foi descartado o sobrenadante e adicionado o inóculo bacteriano previamente preparado, sendo a placa incubada por 24 horas nas mesmas condições anteriormente descritas.

Posteriormente, a microplaca foi centrifugada à 4000 rpm por 10 minutos para coleta do sobrenadantes. Os sobrenadantes foram submetidos a quantificação de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 conforme descrito nos itens 3.6.1.1 e 3.6.1.2.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO PELA SILIMARINA E SILIBINA

O potencial de captura de óxido nítrico pela silimarina e silibina foi avaliado pelas metodologias descritas na literatura com adaptações (BATES et al., 1991; MARCOCCI et al., 1994). Inicialmente, na ausência de luz, foram adicionados aos poços da microplaca de 96 orifícios 50  $\mu$ L do NPS (1,25 mM) (Neon comercial cod. 02232; São Paulo, Brasil) preparados em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0) e 50  $\mu$ L de amostras em diferentes concentrações e incubados por 1 hora a temperatura ambiente com exposição à luz. Após a incubação foram adicionados 100  $\mu$ L de reagente de Griess (1% p/v de sulfanilamida, 0,1% p/v de naftiletilenodiamina e 2,5% v/v de ácido orto-fosfórico) (Neon comercial cod. 02179, 01874 e 00232, respectivamente, São Paulo, Brazil) e a mistura reacional foi lida em 540 nm. Foi realizada ainda, curva de calibração com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) para representação dos dados em concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formado (Anexo).

### 3.7 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A seletividade de uma substância para as células neoplásicas pode ser avaliada pelo cálculo do índice de seletividade (IS), sendo determinada pela relação dos valores obtidos de IC<sub>50</sub> para células neoplásicas e não neoplásicas. O índice é calculado pela seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ célula não neoplásica}}{IC_{50} \text{ célula neoplásica}}$$

Quanto maior o valor desse índice, menos tóxica é considerada a substância (BADISA et al., 2006).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média de três ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos no mínimo 3 vezes.

A curva dose-efeito (concentração x absorvância) para determinação do IC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub>, concentração do agente que reduz em 50% a absorvância espectrofotométrica, foi obtida através de análise de regressão não linear.

A interpretação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias com teste *post-hoc* de Tukey e Bonferroni, onde o nível de significância estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .

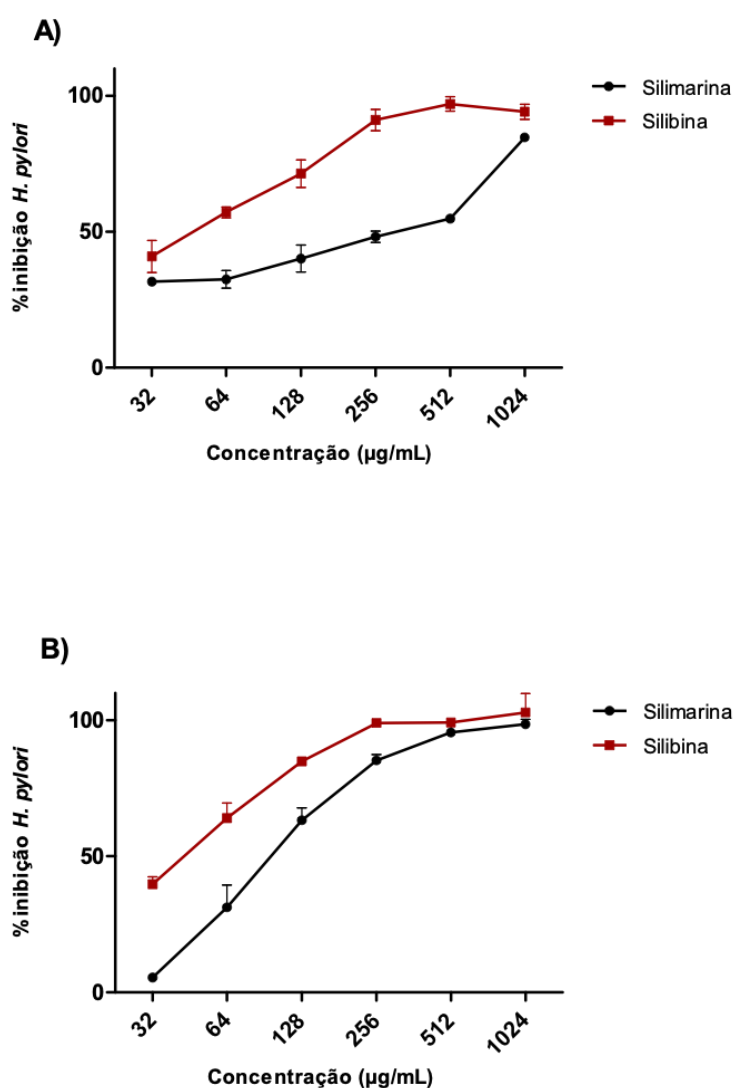
Para realização da análise de dados, foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism 5*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE ANTI-*H. pylori*

#### 4.1.1 Determinação da CIM e CBM

A atividade anti-*H. pylori* da silimarina e silibina sobre as cepas 43504 e 43629 estão apresentadas na Figura 6. As CIMs encontradas para silimarina e silibina para a cepa ATCC 43504 foram de 1024  $\mu\text{g/mL}$  e 256 $\mu\text{g/mL}$  (0,53  $\mu\text{mol/mL}$ ) para a cepa ATCC 43629 foram de 512  $\mu\text{g/mL}$  e 256 $\mu\text{g/mL}$  (0,53  $\mu\text{mol/mL}$ ), respectivamente. Na Tabela 3 podemos observar os valores de CBMs, que somente foi observado para a silibina para a cepa ATCC 43504.



**Figura 6** - Efeito de concentrações crescentes de silimarina e silibina sobre o crescimento de *H. pylori* para as cepas ATCC A) 43504 e B) 43629. Resultados expressos em percentual de inibição  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 3** - Valores de CIM e CBM das substâncias testadas para as cepas 43504 e 43629 de *H. pylori*.

Substância	Cepa 43504		Cepa 43629	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Silimarina	1024 µg/mL	-	512 µg/mL	-
Silibina	256 µg/mL (0,53 µmol/mL)	1024 µg/mL (2,12 µmol/mL)	256 µg/mL (0,53 µmol/mL)	-

#### 4.1.2 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura

A atuação da silimarina e silibina sobre a morfologia bacteriana foram avaliadas através da análise das alterações observadas em *H. pylori* sob tratamento de concentrações sub-inibitórias da amoxicilina (padrão), silimarina e silibina através da avaliação por microscopia eletrônica de varredura (Figura 7).

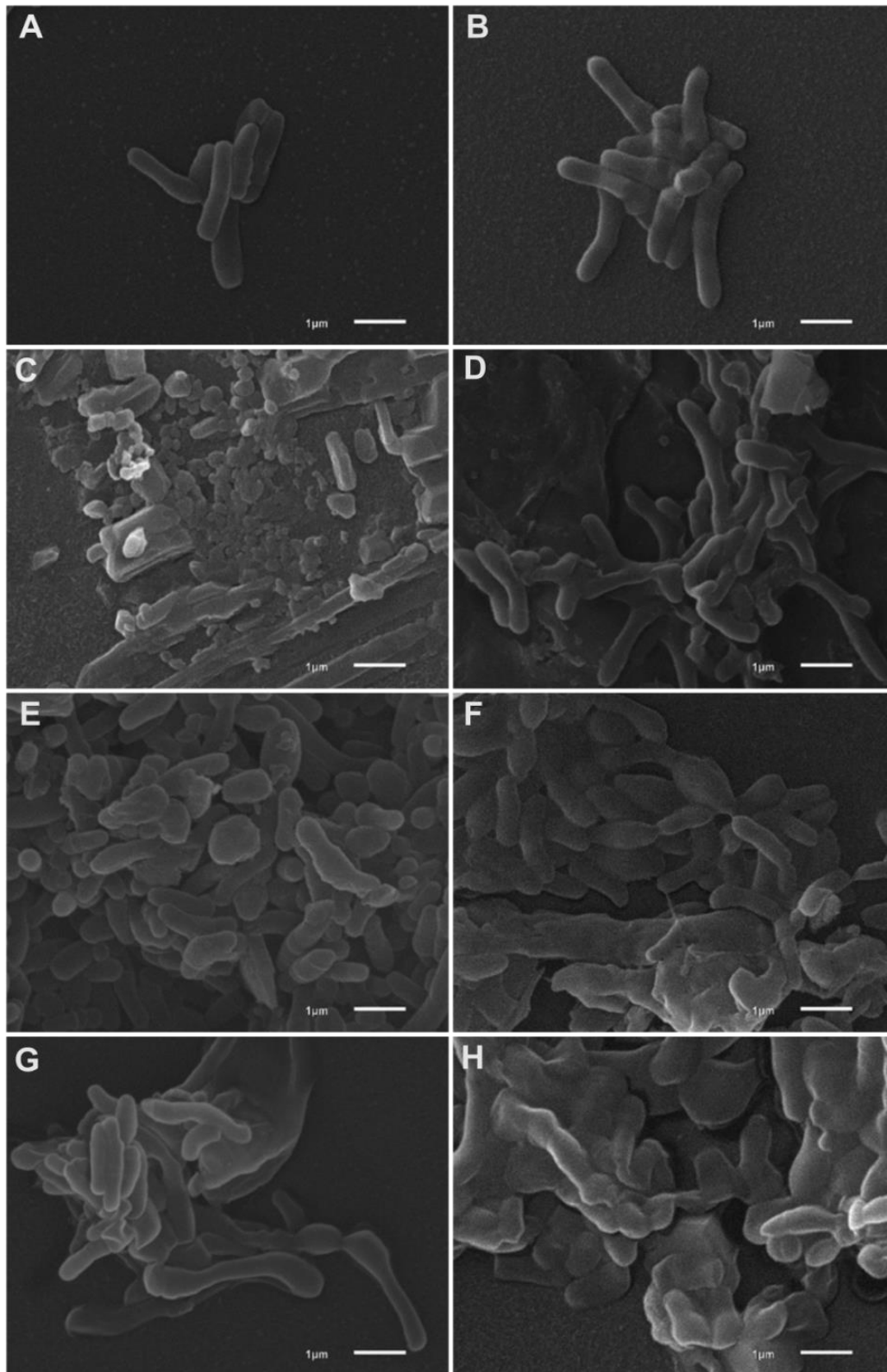
As imagens 6A e 6B apresentam as morfologias das cepas ATCC 43503 e 43629 (controle positivo de crescimento), respectivamente, e a partir delas foi possível evidenciar as alterações decorrentes dos tratamentos com silimarina, silibina e amoxicilina.

As figuras 6C e 6D nos mostram o tratamento com o antimicrobiano padrão, amoxicilina. Observa-se extravasamento de conteúdo intracelular e indução de formações cocóides para a cepa ATCC 43503 (6C). A presença de células filamentosas e formação de *blebs* é visualizada na cepa ATCC 43629 (6D).

O tratamento com silimarina (Figuras 6E e 6F) evidencia a presença de formas cocóides, presença de deformidades na superfície celular e de células lisadas na cepa ATCC 43504 (6E), e na cepa ATCC 43629 (6F) observa-se a presença de agrupamentos de células com redução do tamanho da célula bacteriana.

Já no tratamento com silibina na cepa ATCC 43504 (6G) é possível observar o alongamento da célula bacteriana, bem como a presença de deformidade na superfície celular e de *blebs*, enquanto na cepa ATCC 43629

observa-se a presença de agrupamentos de células com dificuldade em realizar divisão celular



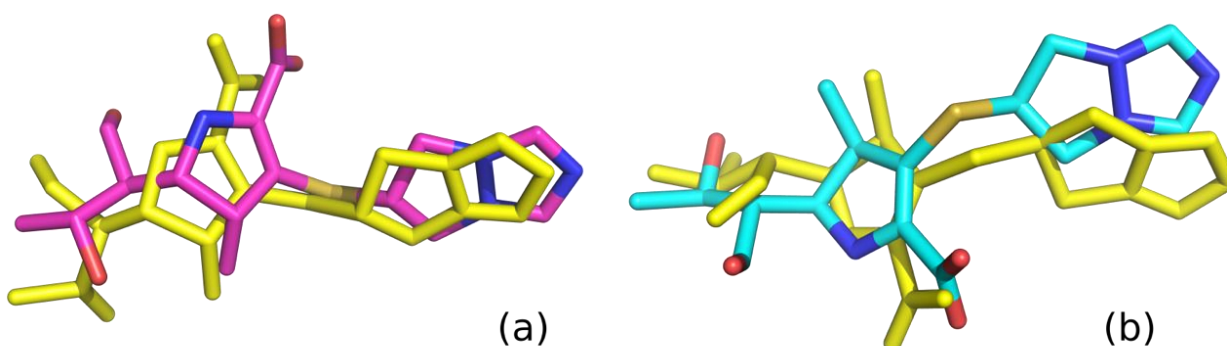
**Figura 7** - Microscopia eletrônica de varredura de *H. pylori* (aumento de 15.000x) sobre os diferentes tratamentos. A) grupo controle da cepa ATCC 43504; B) grupo controle da cepa ATCC 43629; C) amoxicilina em ATCC 43504; D) amoxicilina em ATCC 43629; E) silimarina em ATCC 43504; F) silimarina em ATCC 43629; G) silibina em ATCC 43504; H) silibina em ATCC 43629.

### 4.1.3 Avaliação *in silico* das interações da silibina com PBP2

A capacidade de predição de poses no sítio ativo de PBP2 de *H.pylori* foi validada por meio dos cálculos de *docking* do ligante de referência (*redocking*), biapenem no seu complexo cristalográfico original (RMSD = 1,360; 63,19 *redocking*) e logo em seguida, feito o *docking* cruzado para o complexo cristalográfico de *H. pylori* (RMSD = 1,511; *docking* 54,91) (Tabela 4 e Figura 8).

**Tabela 4** - Resultados de *redocking* e *docking* cruzado para biapenem no sítio ativo de PBP códigos PDB 2ZC3 (*docking*) e 5LP4 (*cross-docking*).

Nome	Código PDB	Resultado <i>Docking</i>
Biapenem	2ZC3	63,19
Biapenem	5LP4	54,91

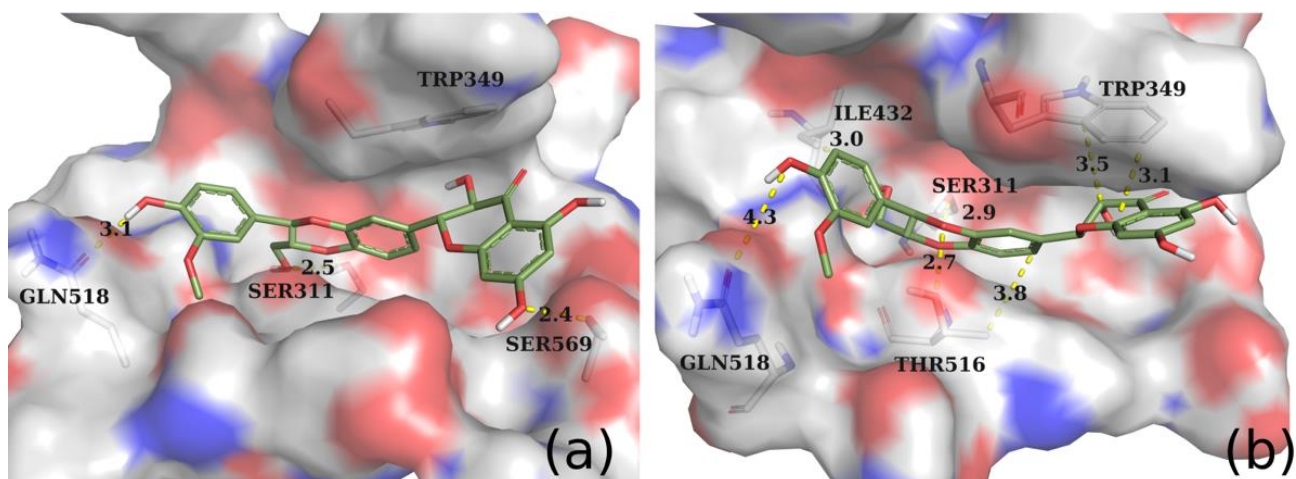


**Figura 8** - *Redocking* e *Cross-docking* do ligante biapenem no sítio ativo de PBP (RMSD = 1,360 Å; ID do PDB: 2ZC3; (RMSD = 1.511; ID do PDB: 5LP4). As poses calculadas por *docking* estão coloridas em amarelo enquanto os átomos de carbono relativo as poses do ligante cristalográfico estão coloridas em rosa (para o complexo de código 2ZC3) e cyan (para o complexo de código 5LP4).

A silibina é descrita como uma mistura de diastereoisômeros em quantidades equimolares (LEE; LIU, 2003). Os resultados dos valores de escore obtidos pelo *docking* das silibina A e B e as poses de *docking* no sítio ativo da PBP de *H. pylori* estão representados nas Tabela 5 e Figura 9 respectivamente.

**Tabela 5** - Resultados de *docking* para Silibina no sítio ativo de PBP de *H.pylori*

Nome	Resultado <i>Docking</i>
Silibina A	57,50
Silibina B	61,02



**Figura 9** - Poses de *docking* para silibina no sítio ativo de PBP de *H.pylori*: a), silibina A, interagindo com os resíduos de aminoácidos GLN518, SER311, SER569; b), silibina B, evidenciando principais interações com os resíduos de aminoácidos ILE432, SER311, THR516, GLN518 e destaque para interação do tipo  $\pi$  com resíduo de TRP349.

#### 4.1.4 Atividade sinérgica com o metronidazol

A avaliação da atividade sinérgica da silimarina e silibina com o metronidazol pelo método de *checkerboard* demonstrou que as interações eram indiferentes tanto para a silimarina quanto para a silibina, com ICIF de 1,0.

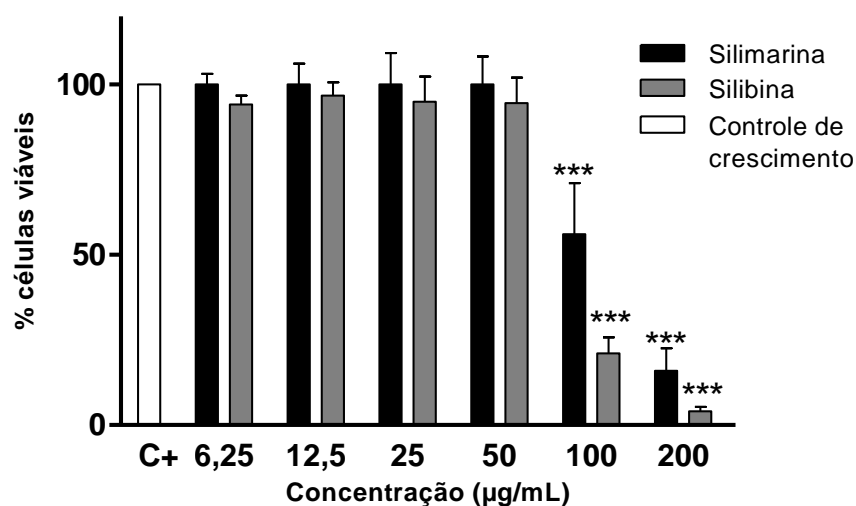
#### 4.2 ATIVIDADE SOBRE DA ENZIMA UREASE

A enzima urease é um dos principais fatores de virulência que permitem o início e manutenção da infecção por *H. pylori* no ambiente gástrico (DUNN; COHEN; BLASER, 1997). Nesse sentido, substâncias que produzam efeito sobre a enzima seriam uma forma de impossibilitar a sobrevivência e colonização do microrganismo no estômago, sendo um potencial alvo para sua erradicação.

A atividade da silimarina e silibina sobre a enzima urease não demonstrou significativa inibição da enzima urease, não ultrapassando  $33,8 \pm 7,79\%$  e  $38,71 \pm 1,14\%$  de inibição da atividade enzimática para silimarina e silibina, respectivamente. O padrão ácido bórico alcançou  $71,56 \pm 5,26\%$  de inibição da atividade enzimática na maior concentração testada ( $1024\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MACRÓFAGOS MURINOS (RAW 264.7)

A avaliação da citotoxicidade da silimarina e silibina em macrófagos foi realizada previamente para a determinação das concentrações das substâncias que seriam utilizadas nos ensaios de indução e inibição de citocinas. A figura 10 mostra que a maior concentração que manteve a viabilidade dos macrófagos acima de 90% foi a de  $50 \mu\text{g/mL}$  para ambas as substâncias, sendo, dessa forma, a concentração máxima testada nos próximos ensaios.



**Figura 10** - Atividade citotóxica da silimarina e silibina em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Valores expressos em percentual de células viáveis em comparação com o controle de crescimento (sem tratamento)  $\pm$  desvio padrão. \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 4.4 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

### 4.4.1 Efeito do tratamento prévio do *H. pylori* com silimarina e silibina na ativação de macrófagos

A produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 em macrófagos estimulados com *H. pylori* após pré-tratamento com concentração sub-inibitórias da silimarina e silibina foi realizada para determinar se os compostos produzem efeitos sobre a bactéria que possam influenciar na ativação dos macrófagos. Foram utilizadas concentrações 1/2 a 1/8 CIM para cada substância de acordo com os resultados obtidos no ensaio de atividade anti-*H. pylori*.

Os resultados obtidos para a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 demonstraram que em nenhuma das concentrações testadas os houve inibição significativa quando comparados ao controle positivo com *H. pylori* sem pré-tratamento.

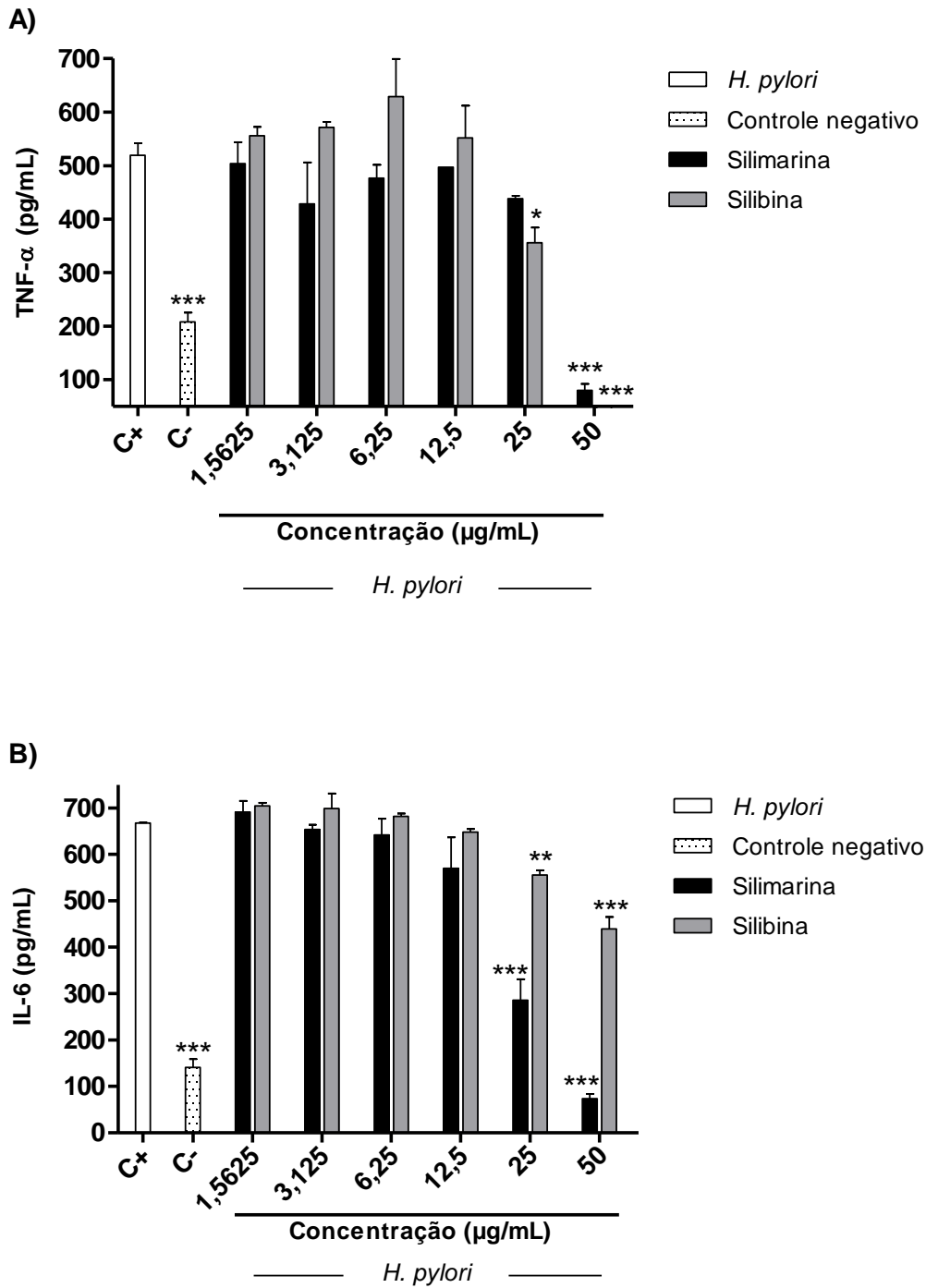
### 4.4.2 Efeito das substâncias sobre macrófagos ativados com *H. pylori*

A atividade anti-inflamatória da silimarina e da silibina foi avaliada por meio dos efeitos sobre a produção de citocinas e mediadores pró e anti-inflamatórios após ativação por *H. pylori*. A presença da bactéria é responsável por um aumento na produção e liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO. Dessa forma, foi avaliado o efeito da silimarina e da silibina em macrófagos RAW 264.7 estimulados com suspensão de *H. pylori*. Para avaliar a capacidade de induzir atividade anti-inflamatória através da produção de IL-10 foram utilizados macrófagos não estimulados.

#### 4.4.2.1 Atividade inibitória sobre citocinas pró-inflamatórias

A atividade inibidora da silimarina e silibina sobre o TNF- $\alpha$  está representada na Figura 11A. Observa-se que ambas as substâncias inibiram a produção da citocina em  $84,54 \pm 2,24\%$  e  $100,00 \pm 3,47\%$  na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  para a silimarina e silibina, respectivamente. Na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  para a silibina, ainda observamos inibição de  $31,44 \pm 5,44\%$ .

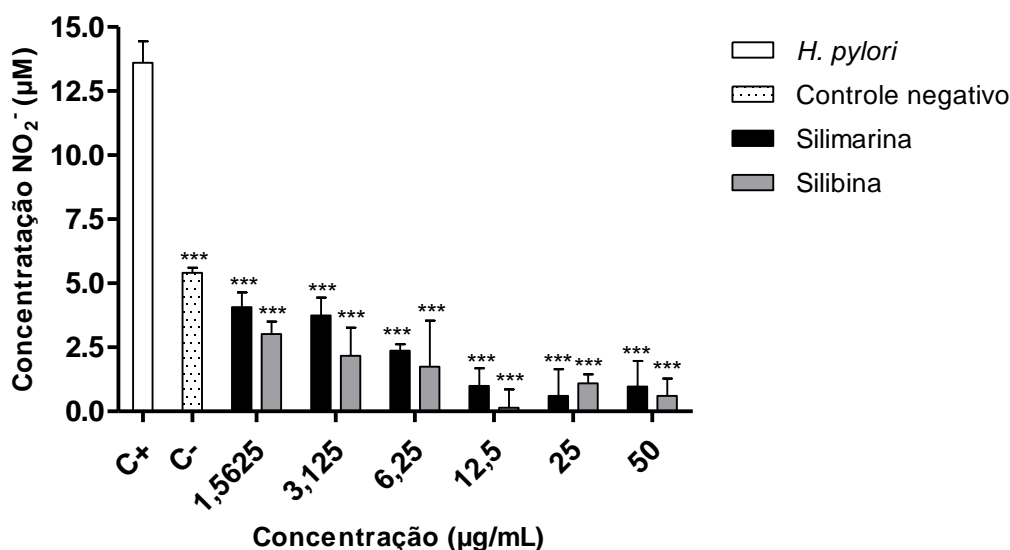
Em relação a avaliação nos níveis de IL-6 ambas as substâncias demonstraram atividade inibitória em macrófagos estimulados com *H. pylori*. Na figura 11B observa-se que nas concentrações de 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , a silimarina apresentou  $88,66 \pm 1,56 \%$  e  $56,83 \pm 6,69 \%$  de inibição, respectivamente. Enquanto a silibina, apesar de um efeito inibitório menor, apresentou  $33,85 \pm 3,83 \%$  de inibição em relação ao controle estimulado na maior concentração testada.



**Figura 11** - Efeito da silimarina e silibina na produção de A) TNF- $\alpha$  e B) IL-6 em macrófagos estimulados por *H. pylori*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  em comparação com o controle estimulado com *H. pylori*.

#### 4.4.2.2 Atividade inibitória sobre o óxido nítrico

A inibição do óxido nítrico em macrófagos estimulados por suspensão de *H. pylori* pela silimarina e silibina esta apresentada na Figura 12. A maior concentração de silimarina e de silibina expressas no gráfico (50 µg/mL) inibem respectivamente 100,0 ± 8,15% e 99,73 ± 10,17%. Além disso, de modo geral, em todas as concentrações, tanto a silimarina quanto a silibina, tiveram influência significativa sobre a produção de NO.



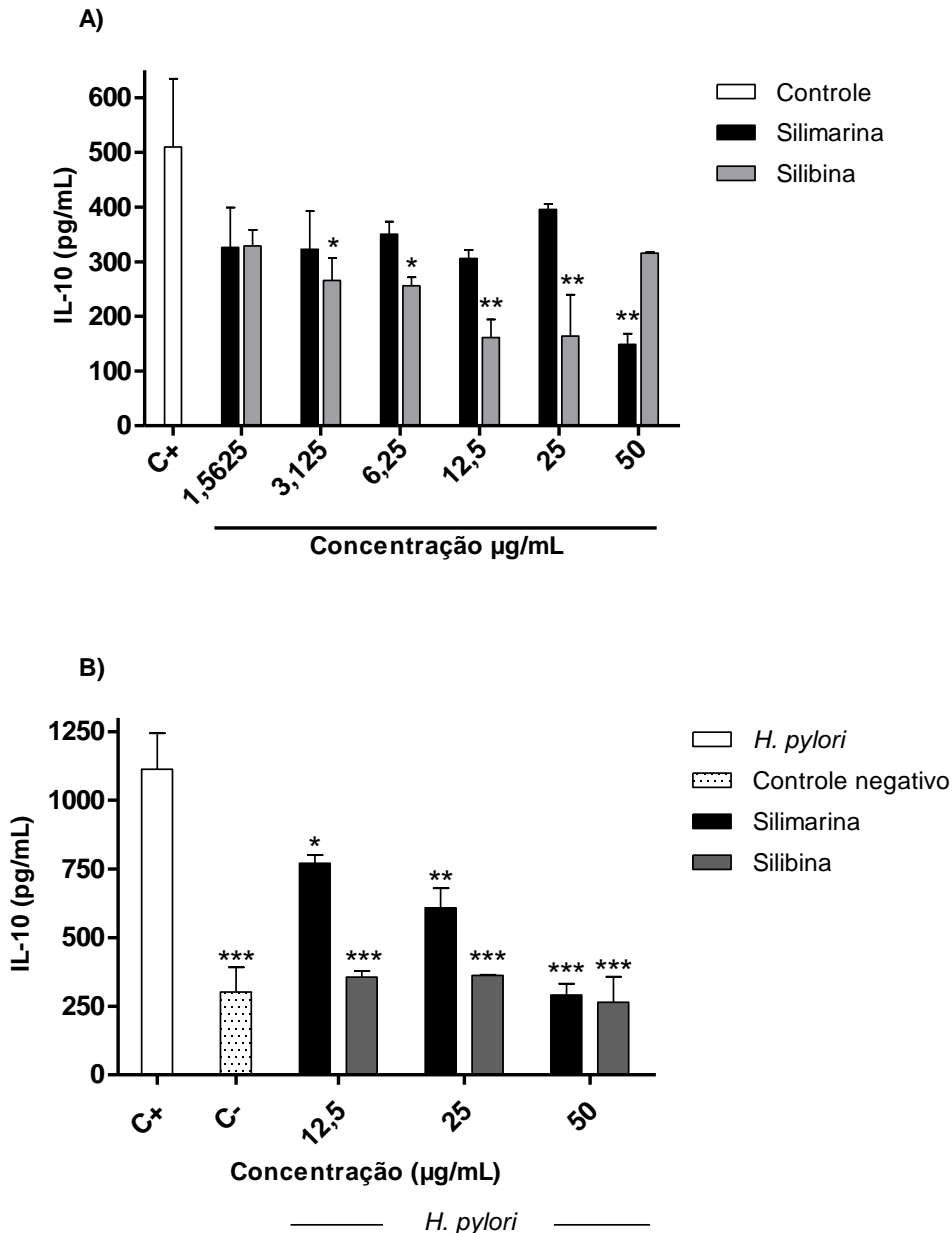
**Figura 12** - Efeito inibitório da produção de óxido nítrico expresso em concentração de nitrito em µM para silimarina e silibina em macrófagos estimulados por *H. pylori*. \*\*\* p < 0,0001 em comparação com o controle estimulado com *H. pylori*.

#### 4.4.2.3 Atividade indutora sobre citocina anti-inflamatória

A Figura 13A representa os resultados encontrados para a indução da IL-10. Todas as concentrações testadas de silimarina e silibina não foram capazes de realizar indução significativa da citocina quando comparado ao controle de produção.

Em virtude do padrão de queda dos níveis de IL-10 observados no ensaio de indução, procedemos um novo ensaio para verificar a possibilidade de inibição da citocina mediante um estímulo de *H. pylori*. Os resultados estão

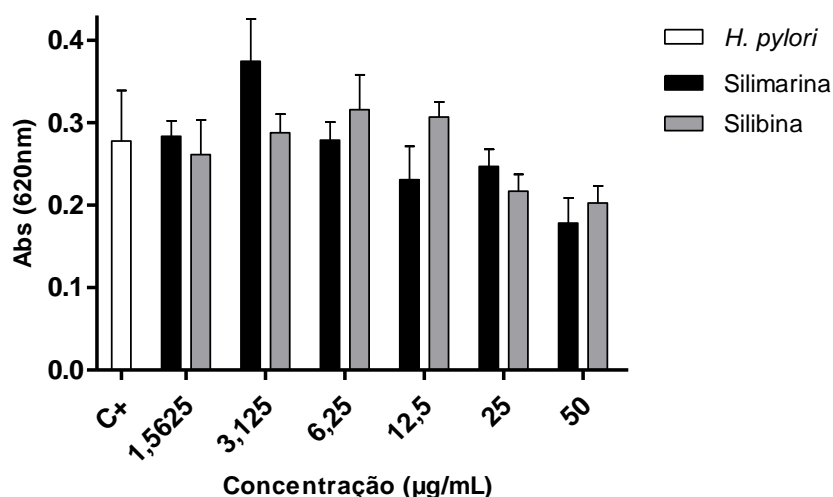
apresentados na Figura 13B. Analisando os níveis de IL-10 ambas as substâncias demonstraram ter uma atividade inibitória em macrófagos estimulados com *H. pylori*. Observa-se que na concentração de 50 µg/mL, a silimarina e a silibina apresentarem 73,88 ± 3,86 % e 70,29 ± 8,41 % de inibição, respectivamente.



**Figura 13** – Efeito A) Indutor na produção da citocina IL-10 por silimarina e silibina em macrófagos não ativados e B) inibitório na produção da IL-10 por silimarina e silibina em macrófagos estimulados por *H. pylori*. \* p < 0,05; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001 em comparação com o controle estimulado com *H. pylori*.

#### 4.4.2.4 Atividade inibitória na produção de superóxido celular

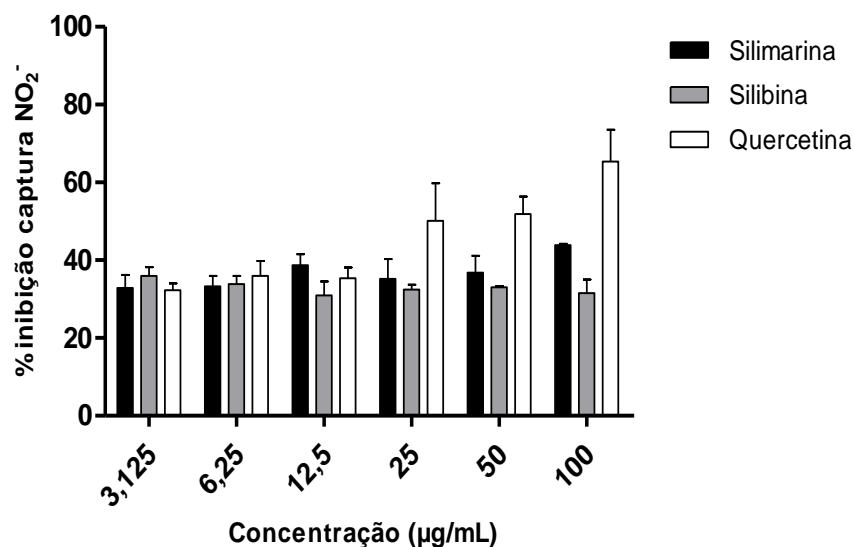
Os resultados de inibição do ânion superóxido pela silimarina e silibina em macrófagos estimulados por suspensão de *H. pylori* podem ser observados na Figura 14. A maior concentração de silimarina e silibina expressas no gráfico conseguiram inibir somente  $35,85 \pm 10,98\%$  e  $27,09 \pm 7,47\%$ , respectivamente.



**Figura 14** - Efeito da silimarina e silibina na redução da produção do ânion superóxido em macrófagos estimulados por *H. pylori*. Valores expressos em absorbância  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CAPTURA DIRETA DE NO

O ensaio químico para captura direto de NO é capaz de medir a capacidade sequestradora da substância. Em relação a silimarina e a silibina, foi observada uma atividade sequestradora discreta como CE<sub>50</sub> de  $107,2 \pm 0,27$  e  $335,0 \pm 8,68$  µg/mL ( $0,694 \pm 0,017$  µmol/mL) respectivamente, enquanto o padrão quercetina apresentou CE<sub>50</sub> de  $40,64 \pm 0,26$  µg/mL. Na Figura 15 apresentamos os percentuais de inibição para o ensaio.



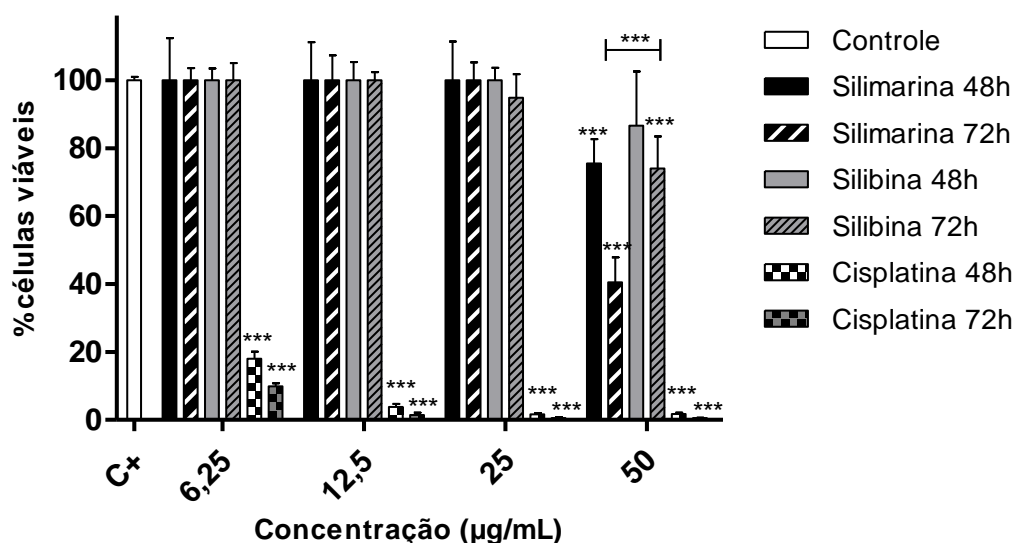
**Figura 15** - Efeito da silimarina e silibina na captura direta de óxido nítrico por ensaio químico. Valores expressos em porcentagem de inibição. \*  $p < 0,001$  em relação ao padrão de inibição quercetina.

#### 4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO (AGS)

A atividade citotóxica da silimarina e silibina em linhagem celular de adenocarcinoma gástrico nos dois tempos de incubação está apresentada na Figura 16.

Os  $IC_{50}$  encontrados para 48 horas de tratamento foram de  $56,30 \pm 0,98$  µg/ mL e  $60,67 \pm 0,95$  µg/mL ( $0,1257 \pm 0,002$  µmol/mL) para silimarina e silibina, respectivamente. Para 72 horas de tratamento os  $IC_{50}$  foram  $46,27 \pm 1,99$ ,  $55,70 \pm 2,14$  e  $4,55 \pm 0,20$  para silimarina, silibina e cisplatina, respectivamente.

O cálculo do IS da silimarina e silibina comparadas ao quimioterápico padrão está apresentado na Tabela 6.



**Figura 16** - Efeito da silimarina, silibina e cisplatina (padrão) em cultura celular de adenocarcinoma gástrico (AGS) em 48 horas e 72 horas. Resultados expressos em porcentagem de células viáveis  $\pm$  desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Tabela 6** - Índice de seletividade para a silimarina, silibina e cisplatina.

Substância	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		IS
	RAW 264.7	AGS	
Silimarina	98,18 $\pm$ 7,41	48h: 56,30 $\pm$ 0,98	1,74
		72h: 46,27 $\pm$ 1,99	2,12
Silibina	85,04 $\pm$ 5,71	48h: 60,67 $\pm$ 0,95	1,40
		72h: 55,70 $\pm$ 2,14	1,52
Cisplatina	4,29 $\pm$ 0,25	48h: 4,84 $\pm$ 0,41	0,88
		72h: 4,55 $\pm$ 0,20	0,94

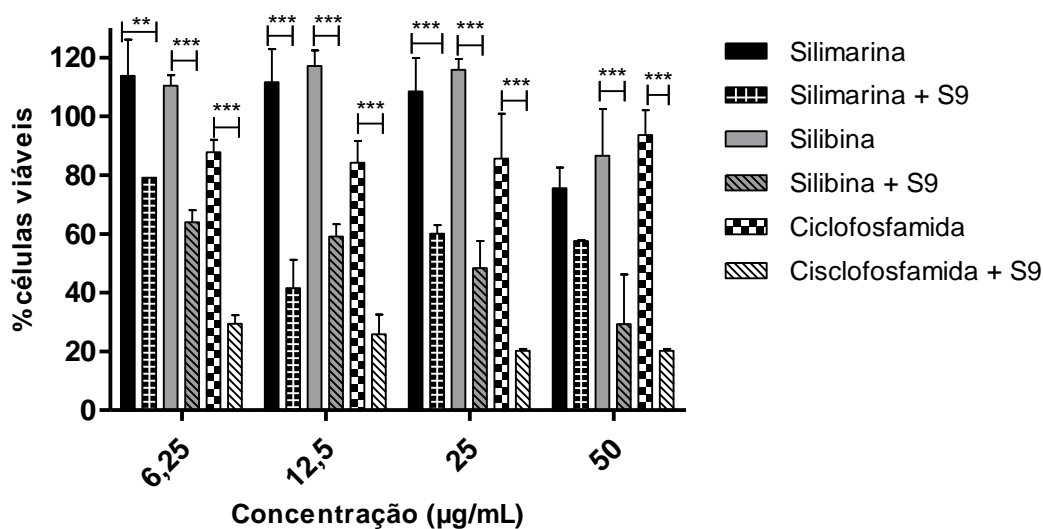
#### 4.6.1 Atividade citotóxica após ativação metabólica

A Tabela 7 apresenta o comparativo dos IC<sub>50</sub> obtidos para silimarina, silibina e ciclofosfamida com e sem o sistema de metabolização após 48 horas de tratamento em células AGS.

O efeito comparativo da silimarina, silibina e ciclofosfamida sem e com o sistema de metabolização sobre a viabilidade celular estão apresentados na Figura 16.

**Tabela 7** - Índice citotóxico (IC<sub>50</sub>) da silimarina, silibina e ciclofosfamida com e sem sistema de metabolização em células AGS.

	sem S9	com S9
Silimarina	56,30 ± 0,98 µg/mL	10,44 ± 0,35 µg/mL
Silibina	60,67 ± 0,95 µg/mL (0,13 ± 0,002 µmol/mL)	10,46 ± 0,25 µg/mL (0,021 ± 0,0005 µmol/mL)
Ciclofosfamida	251,0 ± 0,64 µg/mL (0,96 ± 0,002 µmol/mL)	9,844 ± 0,96 µg/mL (0,038 ± 0,004 µmol/mL)



**Figura 17** - Efeito comparativo da silimarina, silibina e ciclofosfamida mediante a ausência ou presença do sistema de metabolização fração S9 em cultura celular de AGS em 48 horas de tratamento. Resultados expressos em porcentagem de células viáveis ± desvio padrão. \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001.

## 5 DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos de primeira linha para o tratamento de *H. pylori* é um grande desafio no tratamento e erradicação da infecção. As opções de novos antimicrobianos são escassas, com apenas 2 novas substâncias sendo testadas em ensaios clínicos como alternativa terapêutica. Nesse sentido, a busca por terapias não tradicionais, como por exemplo o uso de substâncias derivadas de plantas, tem se tornado uma importante alternativa (MASCELLINO et al., 2017; WHO, 2017). Nesse sentido, o uso de produtos naturais explorando suas atividades antibacterianas e, também, as não antibacterianas tem criado novas possibilidades terapêuticas no controle de infecções (KHAMENEH et al., 2019). Além disso, produtos derivados de plantas geralmente apresentam menos efeitos colaterais quando comparados com substâncias sintéticas (BONIFÁCIO et al., 2014b).

Diante disso, o uso de derivados de plantas tem sido alvo de estudos como alternativas aos medicamentos tradicionais. Alguns estudos escassos relatam a potencial atividade antimicrobiana da silimarina e silibina para alguns micro-organismos, fungos e bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (DE OLIVEIRA et al., 2015; LEE et al., 2003).

Efeitos antimicrobianos são muitas vezes associados a compostos fenólicos, como flavonoides e lignanas (DE OLIVEIRA et al., 2015; OZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011), que compõem flavolignanas como a silimarina. Compostos flavonoides podem ter sua atividade antimicrobiana relacionada a suas atividades de inibição de síntese de ácidos nucleicos (por exemplo por inibição das topoisomerasas), alteração da funcionalidade da membrana plasmática e inibição do metabolismo energético (CUSHNIE et al., 2007; CUSHNIE; LAMB, 2005). Essa atividade antibacteriana de flavonoides pode estar relacionada a presença dos grupos hidroxifenólicos (DE OLIVEIRA et al., 2015)

A melhor atividade anti-*H. pylori* da silibina é demonstrada pelo menor CIM obtido quando comparada a silimarina. A silibina, sendo o composto

majoritário da silimarina, acredita-se que seja a principal responsável pela atividade antibacteriana da silimarina. A silibina em um estudo antimicrobiano para *Escherichia coli* demonstrou possuir a capacidade de promover a desintegração da membrana em altas concentrações, alterar o potencial de membrana, elevar os níveis intracelulares de cálcio e aumentar os níveis de fosfatidilserina, demonstrando que sua atividade antibacteriana é em decorrência de estímulo de apoptose da célula bacteriana (LEE; LEE, 2017).

A partir dos resultados de CIM obtidos para silimarina e silibina, realizamos a análise da morfologia bacteriana após os tratamentos por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A morfologia da célula bacteriana possui correlação muito importante com a manutenção de sua integridade estrutural, transporte de nutrientes e processo de respiração eficaz. Além disso, pode afetar a motilidade e dispersão da célula, formação de biofilme, resistência a fatores ambientais e permitir as interações com outros micro-organismos. *H. pylori* pode assumir algumas formas morfológicas clássicas, como a forma espiralada, que está relacionada ao processo de colonização, e a forma cocóide, conhecida como uma forma viável não cultivável (VNC) e estando essa relacionada a condições desfavoráveis de sobrevivência da bactéria. Outras formas como a de bastonetes e filamentososa alongada também são comumente observadas. Uma das possíveis causas para essas alterações morfológicas é a presença de antimicrobianos no ambiente, representando então uma forma de defesa da bactéria (KRZYZEK; GOŚCINIAK, 2018).

Presença de células cocóides e formação de *blebs* em tratamento com amoxicilina são descritas na literatura, sendo relacionadas com a interação com subunidades de PBPs. Alterações morfológicas em *H. pylori* em decorrência de tratamento com  $\beta$ -lactâmicos estão associadas principalmente com interações às PBP 1 (66kDa), PBP 2 (63kDa) e PBP 3 (60kDa). Alterações com alongamento da célula bacteriana foram observadas em tratamento com aztreonam, sendo associado somente a interações com a PBP 1 (DELONEY; SCHILLER, 1999). Nossas micrografias para o tratamento com amoxicilina evidenciaram a presença de formas cocóides. Além disso demonstraram grande extravasamento de material intracelular indicando morte bacteriana por rompimento de parede celular.

As micrografias obtidas para os tratamentos com silimarina e silibina nos sugerem alterações semelhantes as descritas na literatura para os tratamentos com  $\beta$ -lactâmicos. São evidenciadas as formações cocóides, aparecimento de *blebs* na superfície, alongamento da célula bacteriana e enovelamento das células, indicando dificuldade para divisão celular.

Diante da possibilidade de interação na parede bacteriana observada por meio das imagens obtidas por MEV após tratamento com a silibina e da melhor atividade anti-*H. pylori*, foi realizada a análise *in silico* do sítio ativo de PBP de *H. pylori* para avaliar a possível interação da silibina nesse sítio de ação. Por meio da análise das poses de *docking* no sítio ativo da PBP de *H. pylori*, foi possível observar que, dentre os isômeros, silibina B teria o maior potencial de ligar-se ao sítio ativo da referida enzima, provocando sua inibição e, conseqüentemente, modificações na parede celular. Os resultados de *docking* indicam valores de escore semelhantes ao do ligante de referência, biapenem, com destaque para o valor de escore de silibina B, que é de 61,02, indicando um encaixe favorável na cavidade do sítio ativo.

Diante das atividades já descritas para a silimarina e silibina e em virtude do envolvimento da resposta imunológica e estresse oxidativo no processo infeccioso por *H. pylori*, realizou-se ensaios imunológicos utilizando *H. pylori* como estímulo após pré-tratamento com silimarina e silibina. Apesar dos resultados das micrografias, as alterações observadas parecem não estar relacionado com a capacidade de reduzir a resposta imunológica causada pela presença da bactéria. Isso é constatado pelos resultados obtidos após o estímulo de macrófagos com a bactéria previamente tratada, no qual não observamos alteração significativa na produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparado a célula não estimulada. Posteriormente, procedemos ensaios para avaliar a capacidade da silimarina e silibina interferirem na ativação de macrófagos estimulados com a bactéria sem pré-tratamento. Os resultados obtidos demonstram que as substâncias possuem grande potencial imunomodulador, pois foram capazes de inibir significativamente a produção de NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina central no processo inflamatório, dessa forma, substâncias que produzem efeito de inibição de sua produção e liberação são

importantes opções no controle e tratamento de desordens que estão associadas a um processo inflamatório, como é o caso da infecção por *H. pylori*. Pacientes infectados com *H. pylori* possuem altas concentrações dessa citocina no epitélio gástrico (SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

A IL-6, assim como o TNF- $\alpha$ , é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica produzida como resposta a infecção e lesões teciduais. Atua estimulando respostas de fase aguda e reações imunológicas, por meio de indução de diferenciação de células T citotóxicas e regulação de síntese de imunoglobulinas. Além disso, pode atuar na angiogênese, por meio de estímulo do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), aumentando a permeabilidade vascular o que pode agravar os processos inflamatórios com recrutamento de mais células de defesa. Ou seja, sua síntese contínua e desregulada pode favorecer a piora e cronificação da inflamação ocasionada pela *H. pylori* (CRABTREE et al., 1991; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Estudos mostram que a concentração sérica de IL-6 em pacientes com câncer gástrico é geralmente elevada quando comparada com pacientes saudáveis. É uma citocina muito comum no microambiente tumoral, sendo produzida por diversas células, inclusive as tumorais. Seu nível elevado nos tumores leva a um estado proliferativo com proteção contra apoptose, tornando as células mais resistentes a quimioterapia, por exemplo (VAINER; DEHLENDORFF; JOHANSEN, 2018).

A silibina já se mostrou capaz de inibir a ativação de macrófagos por LPS *in vitro* pela via de sinalização p38 MAPK, uma das vias responsáveis pela ativação de macrófagos por um estímulo externo. Além disso, a silimarina e a silibina são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pela via de sinalização do NF- $\kappa$ B (KIM; LEE; JEON, 2015; TONG et al., 2018).

Assim, a importante inibição a produção e liberação de TNF- $\alpha$  e IL-6 em macrófagos pela silimarina e silibina é uma importante propriedade para o controle do processo inflamatório ocasionado pela infecção promovendo prevenção de lesões que possam futuramente contribuir para desenvolvimento do câncer gástrico.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que em condições fisiológicas, possui a capacidade de regular negativamente a produção de outros mediadores que causam aumento na resposta inflamatória (RAMIS et al., 2017). Contudo, alguns estudos mostram que em paciente infectados com *H. pylori* a IL-10 pode ocasionar no aumento de células bacterianas. Assim, acredita-se que alguns microrganismos possam causar um *up regulation* da citocina de modo a diminuir a resposta imune contra o patógeno e favorecer a sua sobrevivência (ASSIS et al., 2014; SIREGAR; HALIM; SITEPU, 2016). A redução de produção de IL-10 pela silimarina parece estar relacionada com seu efeito inibitório na via de sinalização p38 MAPK (GHARAGOZLOO et al., 2013).

A presença de *H. pylori* é capaz de recrutar e ativar os neutrófilos no tecido gástrico e, como consequência ocorre a produção e liberação de quantidade de ânion superóxido que contribuirão para a lesão tecidual e, posteriormente, a ulceração gástrica (ALLEN et al., 2005). Apesar de estudos mostrarem a alta atividade antioxidante da silimarina e da silibinina por meio da sua atividade sequestradora de superóxido em células PC12 (linhagem de células feocromocitoma de ratos) (JIANG et al., 2016), nossos resultados não mostraram significativa inibição da produção de superóxido em macrófagos murinos. Essa atividade inibitória representaria um benefício na prevenção da lesão tecidual causada pela bactéria.

O processo infeccioso por *H. pylori* com a ativação da resposta inata de macrófagos causa a expressão de iNOS, o que resulta numa produção elevada de NO. Níveis elevados desse mediador estão associados a inflamação e lesão da mucosa do estômago. Além disso, metabólitos de NO estão associados com a carcinogênese gástrica (CHERDANTSEVA et al., 2014; GOBERT et al., 2002).

Um estudo de *docking* molecular demonstrou que a silibina possui uma alta afinidade teórica para iNOS, mostrando que ela é capaz de realizar ligações versáteis e eficientes com a enzima. Além disso, a interação substrato-enzima ocorreu apenas no sítio de ligação do inibidor do substrato da enzima, sugerindo que a inibição da enzima é por competição com o substrato (MALDONADO-ROJAS; OLIVERO-VERBEL, 2012). Esses dados vão ao encontro com os resultados observados pela silibina, contudo, é possível perceber que a silimarina possui uma atividade inibitória mais pronunciada, mostrando que,

provavelmente, o efeito sinérgico com outro componente da mistura seja responsável pela maior atividade.

Analisando os resultados obtidos no ensaio químico de captura e no ensaio biológico de inibição em macrófagos, observa-se que em decorrência do baixo efeito de captura direta o provável mecanismo envolvido na redução dos níveis de NO pela silimarina e silibina se deve a inibição da iNOS.

Contudo, podemos destacar algumas dificuldades encontradas na execução do ensaio de captura de NO. Conforme descrito no item 3.6, o ensaio é realizado com exposição a luz para permitir a liberação de NO pelo NPS. A silimarina é sensível a luz, podendo a exposição a luz ser responsável por sua degradação. Além disso, como não utilizamos a unidade de molaridade para calcular a concentração das substâncias, não foi possível padronizar a quantidade de moléculas disponíveis para a captura de NO, prejudicando assim nossa análise estatística. Em virtude do exposto, fica evidenciado que são necessários estudos mais aprofundados para prever a relação em silimarina e silibina com a produção de NO.

A atividade anticancerígena da silimarina e, sobretudo, da silibina é bem documentada na literatura. Alguns estudos *in vitro* destacam a atividade da silibina quando testada em outras linhagens de células de câncer gástrico SGC-7901, mostrando causar a morte celular por parada de ciclo celular na fase G2 e diminuição nos níveis de proteína quinase, além de morte apoptótica independente da ativação de caspases (ZHANG et al., 2013). Outro estudo mostrou que a atividade anticâncer da silibina em linhagem de células MGC-803 é em decorrência da ativação via STAT3, envolvida nos processos de proliferação e sobrevivência celular (WANG et al., 2014). Contudo, ainda não existe na literatura estudos com linhagem de células de adenocarcinoma gástrico, o principal tipo histológico correlacionado com a infecção por *H. pylori*.

A atividade citotóxica da silimarina e silibina em AGS mostrou-se significativa na concentração de 50 µg/mL para a silimarina nos dois períodos de incubação e para a silibina apenas no maior tempo de incubação. Ainda é possível observar uma diferença significativa de atividade citotóxica entre a silimarina e a silibina na maior concentração testada. Esses resultados demonstram que os efeitos da silimarina e silibina são dose e tempo

dependentes. Além disso, quando comparadas ao quimioterápico padrão através do cálculo de IS, a silimarina e silibina foram consideradas menos tóxicas.

Os resultados obtidos a partir da citotoxicidade após metabolização evidenciam que após a adição do sistema com a fração S9 houve a formação de metabólitos que aumentaram a citotoxicidade frente a linhagem AGS, com consequente diminuição dos IC<sub>50</sub>.

A fração S9 é composta por um homogenato de célula de fígado de rato tratado com um indutor enzimático. Essa mistura é composta de enzimas do citocromo P450, que são as enzimas das reações de fase I do metabolismo, responsáveis pelas reações de oxidação e redução que irão causar o aumento da polaridade da substância (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

A silibina possui até oito posições disponíveis para hidroxilação, contudo somente algumas delas pode ser hidroxiladas em virtude do impedimento estérico da molécula. Já foram identificados em um estudo de metabolização com um sistema microsomal humano alguns possíveis metabólitos da silibina. O principal identificado foi um metabólito resultado da desmetilação do grupo metoxifenil da molécula. Outros metabólitos minoritários foram identificados sendo três monohidroxilados e um dihidroxilado. Os monohidroxilados são um resultado da hidroxilação do anel fenólico ou do anel benzodioxina e os outros dois da hidroxilação do anel benzopirano. O metabólito dihidroxilado é resultado da dupla hidroxilação do anel fenólico. (GUNARATNA; ZHANG, 2003).

A partir da incubação de silimarina com um sistema microsomal hepático realizado com a adição de glutathione na mistura, é possível identificar cerca de quatorze conjugados de glutathione, sendo esses conjugados derivados de estruturas desmetiladas e hidroxiladas, sendo a CYP3A4 a principal responsável por essas reações (CHEN et al., 2018). A viabilidade de hepatócitos humanos após tratamento com os produtos de metabolização, tanto de fase I quanto de fase II, dos componentes isolados a partir da silimarina não resultou em toxicidade para essa linhagem celular (VRBA et al., 2018), mostrando que nossos metabólitos podem ter toxicidade seletiva para a linhagem testada.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo da atividade anti-*H. pylori* relevou que a silibina possui atividade antimicrobiana superior a silimarina. Além disso, as alterações morfológicas provocadas pelas substâncias associadas aos resultados obtidos por modelagem molecular nos permitem sugerir que provavelmente a silibina atua na célula bacteriana inibindo as unidades de PBPs. A atividade sinérgica com o metronidazol nos revelou uma interação indiferente tanto para a silimarina quanto para a silibina e não foi possível observar inibição importante da enzima urease. Além disso, a importante inibição das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 associado a inibição de produção de NO pela iNOS demonstraram que a silimarina e a silibina ter papel importante na atividade imunomoduladora associada ao estímulo provocado por *H. pylori*.

Assim como já observados para outras linhagens cancerígenas, a silimarina e silibina demonstraram possuir potencial atividade antitumoral para células de adenocarcinoma gástrico, sobretudo após exposição a sistema de metabolização, demonstrando que não perdem atividade após a atuação das enzimas hepáticas possuindo metabólitos ainda mais ativos.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABADI, A. T. B. Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 16, p. 2870–2882, 2017.
- ABENAVOLI, L. et al. Milk Thistle in Liver Diseases : Past, Present, Future. **Phytotherap**, v. 1432, n. 10, p. 1423–1432, 2010.
- ABENAVOLI, L. et al. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. **Phytotherapy Research**, n. July, p. 1–12, 2018.
- ABU-SINI, M. et al. Synthesis of 1,2,3-triazolo[4,5-h]quinolone derivatives with novel anti-microbial properties against metronidazole resistant *Helicobacter pylori*. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1–12, 2017.
- AIBA, Y. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living , heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No. 1088. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 11, p. 1–5, 2017.
- ALLEN, L.-A. H. et al. *Helicobacter pylori* Disrupts NADPH Oxidase Targeting in Human Neutrophils to Induce Extracellular Superoxide Release. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3658–3667, 2005.
- ANDHALE, V. A. Silymarin: An overview with its phytopharmacology concept. **American Journal of Pharmtech Research**, v. 6, n. 2, 2016.
- ARAF KESHK, W. et al. Modulatory effect of silymarin on nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 regulated redox status, nuclear factor- $\kappa$ B mediated inflammation and apoptosis in experimental gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 266–272, 2017.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1699–1722, 2010.
- ASSIS, S. et al. IL10 Single Nucleotide Polymorphisms are Related to Upregulation of Constitutive IL-10 Production and Susceptibility to *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, n. 3, p. 168–173, 2014.
- BADISA, R. B. et al. Selective anticancer activity of pure licamichauxiioic-B acid in cultured cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 2, p. 141–145, 2006.
- BAE, S. E. et al. The effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric cancer prevention in healthy asymptomatic populations. **Helicobacter**, v. 23, n. 2, p. 1–10, 2018.
- BAHMANI, M. et al. *Silybum marianum*: Beyond Hepatoprotection. **Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, v. 20, n. 4, p. 292–

301, 2015.

BALTAS, N. et al. Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 46–50, 2016.

BATES, J. N. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. SUPPL. 1, p. S157–S165, 1991.

BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. **Molecules**, v. 22, 2017.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 54, p. 1–10, 2014a.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 54, p. 1–10, 2014b.

BRASIL. **RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**, 2014a. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC\\_138\\_2017\\_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0)>

BRASIL. **Instrução Normativa nº 2, de 13 de maio de 2014 Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”**, 2014b. Disponível em:  
<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf)>

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUTCHER, L. D. et al. Oxidative Stress Resulting From *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 3, n. 3, p. 316–322, 2017.

CALANI, L. et al. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. **Phytomedicine**, v. 20, n. 1, p. 40–46, 2012.

CASTILLO-JUÁREZ, I. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 402–405, 2009.

CHAKRABORTI, S. et al. The Molecular Basis of Inactivation of Metronidazole-

- Resistant *Helicobacter pylori* Using Polyethyleneimine Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.
- CHAMBERS, C. S. et al. The silymarin composition... and why does it matter??? **Food Research International**, p. 339–353, 2017.
- CHEN, Y. et al. Characterization of glutathione conjugates derived from reactive metabolites of seven silymarin isomers. **Xenobiotica**, p. 1–13, 2018.
- CHERDANTSEVA, L. A. et al. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS Production by Macrophages and Lymphocytes in the Gastric Mucosa in Chronic Gastritis. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–6, 2014.
- CHOI, H. S. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, 2006.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. M07-A10, p. 1–87, 2015.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. M100, p. 1–250, 2017.
- COELHO, L. G. V. et al. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arq Gastroenterol**, v. 55, n. 2, p. 97–121, 2018.
- CRABTREE, J. E. et al. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v. 32, n. 12, p. 1473–7, 1991.
- CURADO, M. P.; OLIVEIRA, M. M. DE; FAGUNDES, M. DE A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Latin America and the Caribbean populations: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiology**, v. 60, p. 141–148, 2019.
- CUSHNIE, T. P. T. et al. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1562–1567, 2007.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.
- DE OLIVEIRA, D. R. et al. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. **BioMed research international**, v. 2015, p. 292797, 2015.
- DELONEY, C. R.; SCHILLER, N. L. Competition of various  $\beta$ -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2702–2709, 1999.

- DOORAKKERS, E. et al. *Helicobacter pylori* eradication treatment and the risk of gastric adenocarcinoma in a Western population. **Gut**, v. 67, n. 12, p. 2092–2096, 2018.
- DRYDEN, G. W.; SONG, M.; MCCLAIN, C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 165–170, 2006.
- DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 720–741, 1997.
- ESMAEIL, N. et al. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. **International Immunopharmacology**, v. 50, n. May, p. 194–201, 2017.
- EVANS, D. J. et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2213–2220, 1995.
- FAKHERI, H. et al. *Helicobacter pylori* eradication in West Asia: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10355–10367, 2014.
- FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290–298, 2014.
- FISCHER, C. L. et al. Sphingoid bases are taken up by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and induce ultrastructural damage. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 36–44, 2013.
- FLORA, K. et al. Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 2, p. 139–143, 1998.
- FRANCESCO, V. DE et al. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 2, n. 3, p. 35–41, 2011.
- FRASCHINI, F.; DEMARTINI, G.; ESPOSTI, D. Pharmacology of silymarin. **Clinical Drug Investigation**, v. 22, n. 1, p. 51–65, 2002.
- FU, S. et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1319–1329, 1999.
- GHARAGOZLOO, M. et al. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: The impact on T cell proliferation and cytokine production. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 209–214, 2013.
- GIUSTARINI, D. et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**, v. 440, n. 07, p. 361–380, 2008.

GOBERT, A. P. et al. *Helicobacter pylori* Induces Macrophage Apoptosis by Activation of Arginase II. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4692–4700, 2002.

GOBERT, A. P.; WILSON, K. T. The Immune Battle Against *Helicobacter pylori* Infection: NO Offense. **Trends Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 366–376, 2016.

GONI, E.; FRANCESCHI, F. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. **Helicobacter**, v. 23, n. 1, p. 45–48, 2016.

GRAHAM, D. Y. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5191–5204, 2014.

GUNARATNA, C.; ZHANG, T. Application of liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibinin in human liver microsomes. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 794, n. 2, p. 303–310, 2003.

HASSAN, S. T. S. et al. In vitro synergistic effect of Hibiscus sabdariffa aqueous extract in combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1736–1740, 2016.

HUILGOL, S. V; JAMADAR, M. G. Silymarin, an antioxidant bioflavonoid, inhibits experimentally-induced peptic ulcers in rats by dual mechanisms. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 63–66, 2012.

HUNT, R. H. et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 20, n. 3, p. 299–304, 2011.

INCA. **Câncer de estômago**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>>. Acesso em: 16 set. 2018.

JAHANAFROOZ, Z. et al. Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. **Life Sciences**, v. 213, p. 236–247, 2018.

JIANG, H.-H. et al. Silymarin versus Silibinin: Differential Antioxidant and Neuroprotective Effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress in PC12 Cells. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 5, p. 633–636, 2016.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KHAMENEH, B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 118, p. 1–28, 2019.

- KHAN, F. A. et al. A general introduction to medicinal plants and *Silybum marianum*. **Life Science Journal**, v. 11, n. 9, p. 471–481, 2014.
- KIM, E. J.; LEE, M. Y.; JEON, Y. J. Silymarin inhibits morphological changes in LPS-stimulated macrophages by blocking NF- $\kappa$ B pathway. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 211–218, 2015.
- KIM, S. et al. Silibinin Suppresses TNF- $\alpha$ -Induced MMP-9 Expression in Gastric Cancer Cells through Inhibition of the MAPK Pathway. **Molecules**, v. 14, p. 4300–4311, 2009.
- KRZYZEK, P.; GOŚCINIAK, G. Morphology of *Helicobacter pylori* as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements. **Gastroenterology Review**, v. 13, n. 3, p. 182–195, 2018.
- KVASNICKA, F. et al. Analysis of the active components of silymarin. **Journal of chromatography. A**, v. 990, n. 1–2, p. 239–245, 2003.
- LEE, B.; LEE, D. G. Reactive oxygen species depletion by silibinin stimulates apoptosis-like death in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2129–2140, 2017.
- LEE, D. G. et al. Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. **Archives of pharmacal research**, v. 26, n. 8, p. 597–600, 2003.
- LEE, D. Y.; LIU, Y. Molecular Structure and Stereochemistry of Silybin A, Silybin B, Isosilybin A, and Isosilybin B, Isolated from *Silybum marianum* (Milk Thistle). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1171–1174, 2003.
- LI, H. et al. Inappropriate treatment in *Helicobacter pylori* eradication failure: a retrospective study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 2, p. 130–133, 2018.
- LI, R.; YU, J.; WANG, C. Silibinin promotes the apoptosis of gastric cancer BGC823 cells through caspase pathway. **Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 22, n. 5, p. 1148–1153, 2017.
- LU, S. et al. Silibinin inhibits the migration and invasion of human gastric cancer SGC7901 cells by downregulating MMP-2 and MMP-9 expression via the p38MAPK signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 14, n. 6, p. 7577–7582, 2017.
- MA, H.-Y.; LIU, X.-Z.; LIANG, C.-M. Inflammatory microenvironment contributes to epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6619–6628, 2016.
- MALDONADO-ROJAS, W.; OLIVERO-VERBEL, J. Food-related compounds that modulate expression of inducible nitric oxide synthase may act as its inhibitors. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8118–8135, 2012.
- MALFERTHEINER, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the

- Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 6–30, 2017.
- MANNA, S. K. et al. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 12, p. 6800–9, 1999.
- MANNICK, E. E. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitrotyrosine, and Apoptosis in Helicobacter pylori Gastritis: Effect of Antibiotics and Antioxidants. **Cancer Research**, v. 56, p. 3228–3243, 1996.
- MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract Egb 761. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 2, p. 748–755, 1994.
- MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clinical medicine**, v. 2, n. 2, p. 147–152, 2002.
- MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. **The Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.
- MASCELLINO, M. T. et al. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in Helicobacter pylori infection. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2209–2220, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. 1. ed. Brasília: Departamento de Atenção Básica, 2012.
- MONACK, D. M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent bacterial infections: The interface of the pathogen and the host immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 747–765, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NIH. **Clinical Trials**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- O'MORAIN, N. R. et al. Treatment of Helicobacter pylori infection in 2018. **Helicobacter**, v. 23, p. 1–9, 2018.
- OZÇELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 4, p. 396–402, 2011.
- PILLAI, S. K.; MOELLERINH JR., R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. [s.l: s.n.]. p. 365–440.
- RAINA, K.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Effect of Silibinin in Human Colorectal Cancer Cells: Targeting the Activation of NF-κB Signaling. **Molecular**

**carcinogeneses**, v. 52, n. 3, p. 195–206, 2013.

RAMASAMY, K.; AGARWAL, R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 352–362, 2008.

RAMIS, I. B. et al. Polymorphisms of the IL-6, IL-8 and IL-10 genes and the risk of gastric pathology in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 2, p. 153–159, 2017.

REZAEIMANESH, N. et al. Management of multi-drug resistant *Helicobacter pylori* infection by supplementary, complementary and alternative medicine; a review. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 10, n. 1, p. S8–S14, 2017.

SHIN, J. H. et al. Protective effect of silymarin against ethanol-induced gastritis in rats: Role of sulfhydryls, nitric oxide and gastric sensory afferents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 353–357, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. ed. [s.l: s.n.].

SIPPONEN, P.; MAAROOS, H.-I. Chronic gastritis. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 50, n. 6, p. 657–67, 2015.

SIREGAR, G.; HALIM, S.; SITEPU, R. Serum IL-10, MMP-7, MMP-9 levels in helicobacter pylori infection and correlation with degree of gastritis. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 359–363, 2016.

SJOMINA, O. et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 23, n. 1, p. e12403, 2018.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **The New English Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175–1186, 2002.

SURAI, P. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 204–247, 2015.

TANAKA, T.; KAWASE, M.; TANI, S.  $\alpha$ -Hydroxyketones as inhibitors of urease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 501–505, 2004.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 6, n. 10, p. 1–16, 2014.

TONG, W. W. et al. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

VAINER, N.; DEHLENDORFF, C.; JOHANSEN, J. S. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 51, p. 29820–29841, 2018.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, ago. 2003.

VRBA, J. et al. Metabolism of flavonolignans in human hepatocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 94–101, 2018.

WANG, C. A. et al. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein promotes myeloperoxidase release from human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 1, p. 52–56, 2008.

WANG, Y.-X. et al. Silibinin Inhibits Proliferation, Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer MGC803 Cells Via STAT3 Pathway Inhibition. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 16, p. 6791–6798, 2014.

WANG, Y. C. et al. In vitro activity of *Impatiens balsamina* L. against multiple antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 37, n. 4, p. 713–722, 2009.

WANG, Y. C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10368–10382, 2014.

WHO. **Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori: views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. [s.l.: s.n.].

WHO. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>>.

WIANOWSKA, D.; WIŚNIEWSKI, M. Simplified procedure of silymarin extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 2, p. 366–372, 2015.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 713–739, 2010.

YAMAOKA, Y.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. **Future Oncology**, v. 10, n. 8, p. 1487–1500, 2014.

YANG, J. C.; LU, C. W.; LIN, C. J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5283–5293, 2014.

YAO, X.; SMOLKA, A. J. Gastric parietal cell physiology and *Helicobacter pylori* - Induced disease. **Gastroenterology**, v. 156, n. 8, p. 2158–2173, 2019.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80–89, 2006.

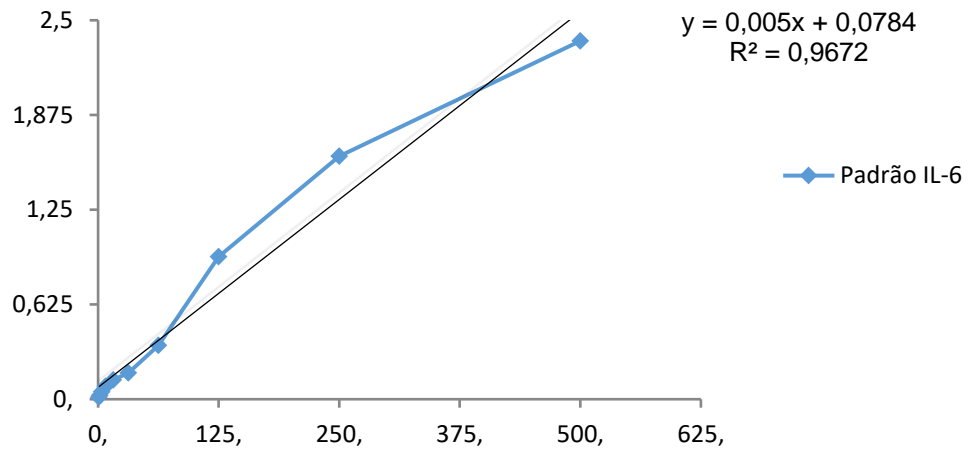
ZENGIN, G. et al. Chromatographic analyses, in vitro biological activities, and cytotoxicity of *Cannabis sativa* L. Essential oil: A multidisciplinary study. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1–26, 2018.

ZHANG, Y. et al. Silibinin triggers apoptosis and cell-cycle arrest of SGC7901 cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 397–403, 2013.

ZHU, H. J. et al. An assessment of pharmacokinetics and antioxidant activity of free silymarin flavonolignans in healthy volunteers: A dose escalation study. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 9, p. 1679–1685, 2013.

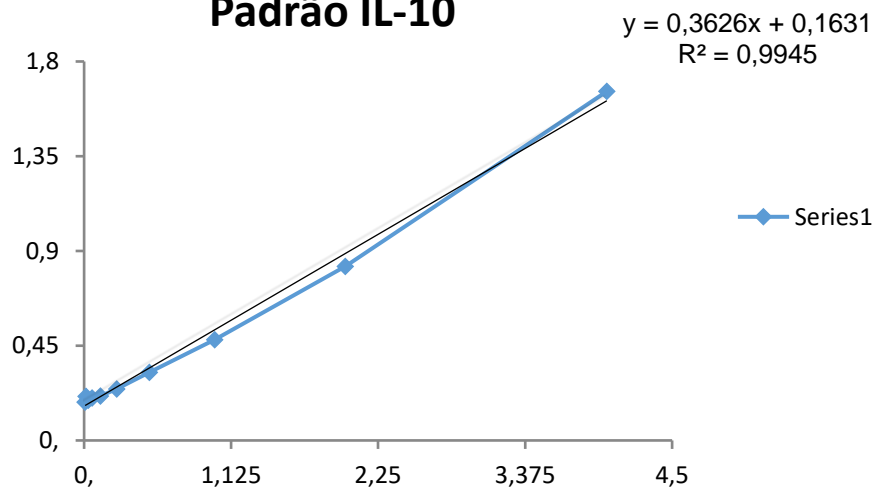
## 8 ANEXOS

### Padrão IL-6



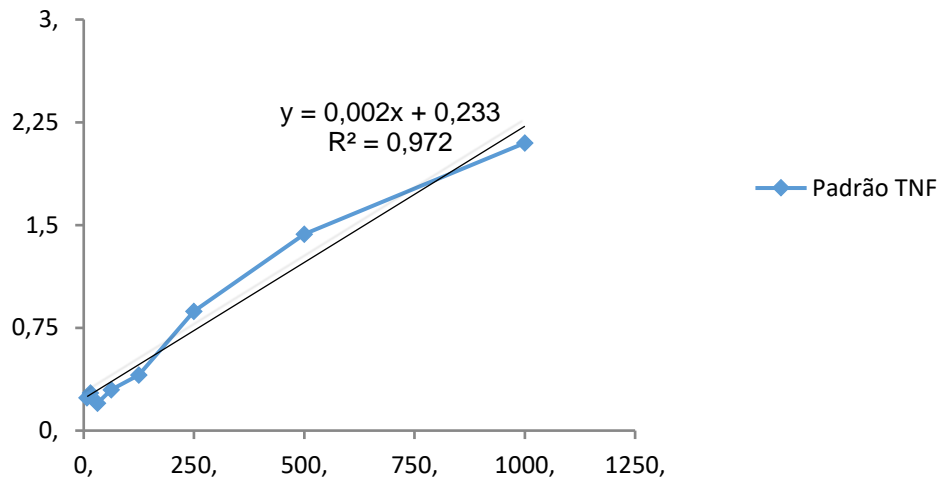
Anexo: Curva padrão IL-6

### Padrão IL-10



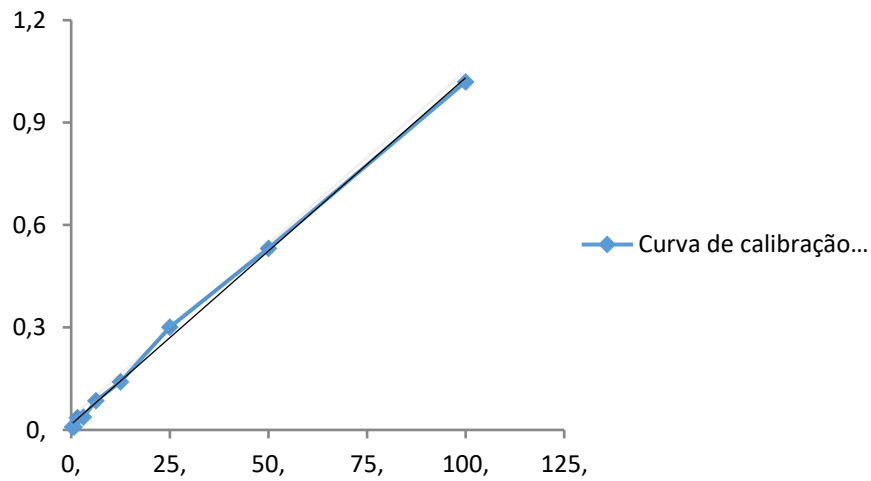
Anexo: Curva padrão IL-10

## Padrão TNF



Anexo: Curva padrão TNF- $\alpha$

## Curva de calibração NaNO<sub>2</sub>



Anexo: Curva de calibração NaNO<sub>2</sub>