



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-OBESIDADE DA SILIMARINA (*Silybum
marianum* L.) EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

FELIPE RAMON CUNHA DA SILVA

FORTALEZA

2024

FELIPE RAMON CUNHA DA SILVA

EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-OBESIDADE DA SILIMARINA (*Sylibum
marianum L.*) EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha da pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58e

Silva, Felipe Ramon Cunha da.

Efeito antioxidante e antiobesidade da silimarina (*Silybum marianum* L.) em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6 / Felipe Ramon Cunha da Silva. – 2024. 87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

1. Obesidade. 2. Silimarina. 3. Estresse oxidativo. 4. Esteatose hepática. 5. Citocinas. I. Título.

CDD 615

FELIPE RAMON CUNHA DA SILVA

EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-OBESIDADE DA SILIMARINA (*Sylibum
marianum L.*) EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, da Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da
Universidade Federal do Ceará.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra Renata de Sousa Alves

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me feito como sou, por me permitir trilhar meu caminho a meu modo e por se fazer presente.

Aos meus pais, Ana e Hércules, pelo amor e carinho, por todos os esforços e por acreditarem em mim.

A minha tia Eliana, por sempre cuidar de mim quando mais preciso, por sempre ter um olhar carinhoso e acolhedor e por me amar como sou. Agradeço a Deus pela sua vida. Dedico todas as minhas conquistas a você.

Às minhas irmãs, Amanda e Esther, por me entenderem sem que seja necessário uma única palavra. Agradeço por serem inspiradoras e por serem tão fortes.

Aos meus primos, Flávio, Beatriz, Débora, Rômulo e Matheus por estarem presentes e pelos momentos de brincadeiras e gargalhadas. Que possamos estar juntos por muitos anos.

Aos meus amores, Yuri e Sofia, que me proporcionam tantos momentos de felicidade, por quem me sinto amado e respeitado.

A minha amiga Nívea, que me dá tanto carinho e suporte.

Ao meu querido amigo e orientador, Prof. Ramon, que me acolheu e me mostrou como a universidade pode ser um lugar de aprendizado, de acolhimento e crescimento. Agradeço por ter me mostrado esse caminho e por ter me lembrado de um sonho de criança que havia esquecido, o de ser cientista. Obrigado por me ajudar a trilhar meu caminho, pelos conselhos, por confiar no meu trabalho, pela paciência e por ser tão inspirador. Obrigado por fazer da universidade um ambiente de diversidade e aceitação.

Aos amigos que fiz ao longo desses anos, Emanuel, Mac, Mateus, Lyanna, Vitor, Bruna, Marcelo, Beatriz, Letícia, Gabriel, Davi, Naiara, John, Glautemberg e Felipe. Agradeço em especial àqueles que participaram e contribuíram com o meu trabalho, que foi mais fácil pela ajuda e amizade de vocês. A todos os membros do Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX), agradeço por terem se disponibilizado e pela

dedicação.

A minha amiga Lorena, por ser uma profissional inspiradora e com quem eu desejo compartilhar muitos momentos da vida.

Aos professores Janete Soares, Said Fonseca, Juliana Ueda, Glaycianne Moraes, Janaína Evangelista, Márcia Marinho e Emanuel Marinho, pelas importantes contribuições para a realização deste trabalho.

À Profa. Alice, prof. Tiago e profa Goretti, pelas contribuições neste trabalho. Ao Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) por todo o suporte para que essa pesquisa fosse realizada.

À banca, professoras Alice Martins e Renata Alves, pelas contribuições ao trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), ao Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas (PGCF) e a Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo aprendizado e desenvolvimento profissional.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram com a idealização e execução desse trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde associado ao acúmulo excessivo de gordura no organismo, o que leva ao estresse oxidativo e inflamação, descritos como fatores importantes no desenvolvimento da doença e de suas comorbidades. Apesar disso, a atual farmacoterapia é limitada, onerosa e negligencia o estresse oxidativo e inflamação. Nesse contexto, flavonoides têm mostrado potencial como candidatos promissores no estudo de novas terapias antiobesidade, como a silimarina (*S. marianum* L.), um extrato rico em flavonoides, utilizado como hepatoprotetor devido às suas propriedades antioxidantes. Então, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antiobesidade da silimarina em modelo animal de obesidade induzida por dieta hipercalórica (RH). Para isso, camundongos machos C57BL/6 receberam RH por 55 dias. Os grupos experimentais foram tratados com silimarina (100, 10 e 1 mg/kg) ou orlistate (30 mg/kg). Massa corporal, consumos de ração e água foram medido diariamente, e no último dia, plasma, tecidos adiposo e hepático foram colhidos. Como resultados, RH induziu obesidade nos animais não tratados, enquanto aqueles tratados com silimarina apresentaram redução no ganho de massa corporal cerca de 40%, o que estava correlacionado com a redução da massa dos tecidos hepático e adiposo, bem como com a deposição de triglicerídeos. A silimarina foi capaz de melhorar o metabolismo lipídico e a função hepática reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e a atividade das transaminases ALT e AST. O tratamento com silimarina reduziu as alterações dos níveis de TBARS e GSH, bem como da atividade da superóxido dismutase, nos dois tecidos. Adicionalmente, silimarina preveniu a produção e liberação de IL-1 β em tecido hepático e adiposo, além de promover a manutenção dos níveis de adiponectina no tecido adiposo. Ademais, simulações de docking molecular foram realizadas com a enzima lipase pancreática (LP), mostrando a ocorrência de possíveis interações com o sítio catalítico e outras regiões de importância para o funcionamento da enzima. Em conclusão, os resultados mostraram que os efeitos antioxidante e anti-inflamatório da silimarina melhoraram o metabolismo lipídico, o que levou à redução da deposição de triglicerídeo nos tecidos hepático e adiposo, refletindo na diminuição da massa corporal dos animais e destacando o seu potencial na terapia antiobesidade.

Palavras-chave: Obesidade; silimarina; estresse oxidativo; esteatose hepática; citocinas.

ABSTRACT

Obesity is a health problem associated to fat accumulation, which leads to oxidative stress and inflammation, described as key-factors on its pathway and related comorbidities. Despite that, the current pharmacotherapy is still limited, onerous and neglects oxidative stress and inflammation. In this context, flavonoids have shown potential as anti-obesity drugs, such as silymarin (*S. marianum* L.), a flavonoid-rich extract used as hepatoprotector due its antioxidant properties. Then, this work aimed to evaluate anti-obesity effect of silymarin in a high-fat diet-induced (HFD) obesity model. For this, C57BL/6 male mice received HFD for 55 days. Groups were treated with silymarin (100, 10 and 1 mg/kg) or orlistat (30 mg/kg). Body weight (BW), food and water intake were measured daily, and on the last day, plasma, adipose and hepatic tissue were collected. As results, HFD induced obesity in untreated animals, while animals treated with silymarin presented reduced gain of BW about 40%, which was correlated with reduced mass of hepatic and adipose tissues, and deposition of triglycerides. Silymarin was able to improve lipid metabolism and hepatic function reducing plasmatic cholesterol, triglycerides, and transaminases levels. Silymarin caused reduction on TBARS levels and increasement of GSH and superoxide dismutase activity on both adipose and hepatic tissues. Additionally, silymarin was able to prevent IL-1 β production and release in hepatic and adipose tissue, as well as maintained adiponectin levels in adipose tissue. Furthermore, molecular docking simulations were performed with pancreatic lipase target, showing the possible interactions with residues from the catalytic site and other important regions of this enzyme. In conclusion, the results showed that silymarin antioxidant and anti-inflammatory effects improved lipid metabolism which leads to reduced deposition of triglycerides in hepatic and adipose tissues, and reduction of body weight.

Keywords: Obesity; Silymarin; oxidative stress; hepatic steatosis; cytokine.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ala – alanina

ALT – alanina aminotransferase

Arg – arginina

Asn – asparagina

Asp – aspartato

AST – aspartato aminotransferase

AUC – área sob a curva

BSA – solução de albumina sérica bovina

CEUA-UFC – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Ct – colesterol total

CT – controle

Cys – cisteína

DTNB – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

EHNA – esteatose hepática não alcoólica

EPM – erro padrão da média

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

Gln – glutamina

GLP-1 – *glucagon-like peptide 1*

Gly – glicina

GO – glutationa oxidase

GR – glutationa redutase

GSH – glutationa reduzida

GSH-Px – glutaiona peroxidase

GSSG – glutationa oxidada

HDL – lipoproteínas de alta densidade

H.E. – hematoxilina e eosina

HGF – fator de crescimento hepático

His – histidina

IL-1 β – interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
IL-8 – interleucina 8
Ile – isoleucina
IMC – índice de massa corporal
Isb A – isosilibina A
Isb B – isosilibina B
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
Leu – leucina
LP – lipase pancreática
Lys – lisina
MDA – malondialdeído
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MUP – ácido metoxiundecilfosfínico
NF- κ B93 – fator nuclear κ de cadeia leve ativador de células B
Nrf2 – fator nuclear derivado de eritróide 2
OMS – Organização Mundial de Saúde
Orl – orlistate
PCR – proteína C reativa
PDB – *Protein Data Bank*
Phe – fenilalanina
PNS – Pesquisa Nacional de Saúde
PPR γ – receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
Pro – prolina
RH – ração hipercalórica
RMSD – *Root Mean Square Deviation*
RP – ração padrão
Ser – serina
S – silimarina
Slb A – silibina A
Slb B – isosilibina B
Slc – silicristina
Sld – silidianina
SOD – superóxido dismutase

SX – ligação de sulfeto

TA – tecido adiposo

TAB – tecido adiposo branco

TAM – tecido adiposo marrom

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Tg – triglicerídeo

TNF- α – fator de necrotumoral

Tris – tampão tri-hidroximetil-aminometano

Trp – triptofano

Tyr – tirosina

Txf - taxifolina

VEGF-A – fator de crescimento vascular endotelial A

ΔG – energia de afinidade

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Grupos experimentais.....	31
Tabela 1 – Composição nutricional das rações padrão e hipercalórica.....	30
Tabela 2 – Valores de AUC da evolução de massa corporal de camundongos C57BL/6 durante modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.....	41
Tabela 3 – Variação de massa corporal dos camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica ao início e fim do experimento.	42
Tabela 4 – Área sob a curva do consumo médio de ração e água de camundongos C57BL/6 em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.....	44
Tabela 5 – Níveis plasmáticos de colesterol total (Ct), triglicerídeos (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	45
Tabela 6 – Valores das massas, lipídeos totais e triglicerídeos dos tecidos hepático e adiposo dos camundongos submetidos ao modelo de obesidade	48
Tabela 7 – Valores médios dos marcadores de estresse oxidativo em tecido adiposo e fígado de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade	52
Tabela 8 – Níveis teciduais de mediadores inflamatórios de camundongos submetidos a modelo de obesidade	54
Tabela 9 – Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados entre os ligantes e a enzima lipase pancreática obtidos por docking molecular	57
Tabela 10 – Interações dos principais componentes da silimarina com a enzima lipase.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do orlistate	20
Figura 2 – Silimarina (<i>Silybum marianum</i> L. Gaernt.).....	23
Figura 3 – Principais componentes do extrato de silimarina (<i>S. marianum</i> L.)	24
Figura 4 – Linha do tempo do modelo de indução de obesidade em camundongos C57BL/6.	31
Figura 5 – Reação de detecção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).	33
Figura 6 – Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida e oxidada.....	34
Figura 7 – Esquema de processamento histológico.....	36
Figura 8 – Evolução da massa corporal de camundongos C57BL/6 durante modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica	40
Figura 9 – Área sob a curva (AUC) da evolução da massa corporal de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica	41
Figura 10 – Área sob a curva (AUC) do consumo de ração e de água de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica	43
Figura 11 – Marcadores bioquímicos plasmáticos de camundongos submetidos ao modelo de obesidade	45
Figura 12 – Tecidos hepático (A) e adiposo (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo experimental de obesidade	46
Figura 13 – Massa, lipídeos totais e triglicéridos de tecido hepático (A, C e E) e adiposo (B, D e F) de camundongos C57BL/6 em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica	47
Figura 14 – Correlação das massas de tecido com a massa corporal dos animais no final do experimento.	49
Figura 15 – Marcadores de estresse oxidativo no tecido adiposo (A, C e E) e tecido hepático (B, D e F) de camundongos submetidos ao modelo de obesidade.....	51
Figura 16 – Níveis de mediadores inflamatórios em amostras de tecido hepático (A) e adiposo (B e C) de camundongos submetidos ao modelo de obesidade	53
Figura 17 – Análise histológica de tecido hepático de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.....	55
Figura 18 – Análise histológica de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.....	56

Figura 19 – Complexo de interação entre a lipase pancreática com os compostos presentes na silimarina.....	58
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos epidemiológicos da obesidade	15
1.2	Classificação e etiologia da obesidade	16
1.3	Fisiopatologia da obesidade, estresse oxidativo e inflamação	17
1.4	Tratamento da obesidade	19
1.5	Produtos naturais como terapia antiobesidade	21
1.6	A silimarina como ferramenta farmacológica	22
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Análise experimental <i>in vivo</i>	29
4.1.1	Animais e aspectos éticos	29
4.1.2	Produção da ração hipercalórica	29
4.1.3	Avaliação do efeito antiobesidade da silimarina em camundongos	30
4.1.4	Análise de marcadores bioquímicos plasmáticos	31
4.1.5	Lipídios totais e triglicerídeos em tecidos adiposo e hepático	32
4.1.6	Análise de marcadores de estresse oxidativo	32
4.1.6.1	Dosagem de proteínas totais	32
4.1.6.2	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	33
4.1.6.3	Glutathiona reduzida (GSH)	34
4.1.6.4	Atividade relativa da superóxido dismutase (SOD)	35
4.1.7	Análise de marcadores inflamatórios	35
4.1.8	Análise histológica	35
4.1.8.1	Processo de inclusão e microtomia dos tecidos hepáticos e adiposo	36
4.1.8.2	Coloração histológica com hematoxilina e eosina (H.E.)	37
4.1.9	Análise estatística	37
4.2	Docking molecular	37
4.2.1	Preparação dos ligantes e receptor	37
4.2.2	Condições das simulações	38
5	RESULTADOS	40
5.1	Análise do modelo de indução de obesidade	40

5.1.1	Massa corporal de camundongos C57BL/6.....	40
5.1.2	Consumo de ração e água de camundongos durante modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica	42
5.1.3	Marcadores bioquímicos plasmáticos.....	44
5.1.4	Massa e conteúdo lipídico dos tecidos adiposo e hepático.....	46
5.1.5	Correlação entre massa corpórea e tamanho tecidual.....	48
5.1.6	Marcadores de estresse oxidativo	49
5.1.7	Mediadores inflamatórios	52
5.1.8	Análise histológica dos tecidos adiposo e hepático.....	54
5.2	Docking molecular	57
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO I.....	83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da obesidade

A obesidade consiste no acúmulo excessivo de gordura no organismo, podendo levar a complicações metabólicas que oferecem riscos à saúde do indivíduo. Nos últimos anos, a obesidade emergiu como um desafio global, transformando-se em um problema de saúde pública, sendo considerada, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma pandemia. Segundo dados apresentados no Fórum da Cúpula da China do Dia Mundial da Obesidade em 2022, cerca de 40% (2 bilhões) dos adultos apresentam sobrepeso ou obesidade no mundo todo (LI et al., 2023; MAYORAL et al., 2020; ZHOU et al., 2023).

No Brasil, as mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas no último século resultaram em uma transição nos padrões nutricionais da população, com uma diminuição progressiva da desnutrição e um aumento alarmante da obesidade. De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), em 2020, 96 milhões de adultos apresentavam condição de sobrepeso, enquanto mais de 40 milhões de pessoas tinham obesidade (BRASIL, 2020).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a obesidade representa o maior fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, além de condições patológicas como resistência insulínica, disfunção endotelial e dislipidemias (ALMEIDA et al., 2017; GUEDES et al., 2019), predispondo o indivíduo à diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doença arterial coronariana, aterosclerose, asma e algumas doenças mediadas pelo sistema imunológico, tais como artrite, doença de Crohn, e câncer. Embora estas associações tenham sido discutidas em várias triagens clínicas, os mecanismos e os protocolos utilizados para intervenções terapêuticas permanecem indefinidos (FRIEDENREICH; RYDER-BURBIDGE; MCNEIL, 2021; HASANI et al., 2021; TOSCA; SCHIAVETTI; CIPRANDI, 2021).

Dessa forma, o número de mortes causadas por doenças, que tem a obesidade como fator de risco, vem crescendo com o passar dos anos. Projeções epidemiológicas mostram como a distribuição de mortes relacionadas à obesidade atingiu nível global (RITCHIE; ROSER, 2017).

1.2 Classificação e etiologia da obesidade

A classificação da obesidade é feita, de forma usual, conforme o índice de massa corporal (IMC), que considera a massa e altura do indivíduo. Entretanto, este parâmetro não é uma medida fidedigna em alguns casos, uma vez que desconsidera a composição corporal, bem como as influências de gênero e etnia. Desse modo, uma avaliação mais precisa deve ser realizada, utilizando medidas antropométricas e bioimpedância (ROMERO-CORRAL et al., 2008).

De acordo com o IMC, a população geral é colocada em cinco categorias: abaixo do peso (IMC < 18,5 kg/m²), peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²), obesidade classe I (IMC dentre 25,0 e 29,9 kg/m²), obesidade classe II (IMC entre 30,0 e 39,9 kg/m²) e obesidade classe III (IMC > 40 kg/m²) (LORENZO, 2016).

O desenvolvimento de obesidade é de etiologia multifatorial, podendo estar relacionado com a dieta, prática de atividades físicas e exposição à contaminantes químicos que podem alterar a expressão de genes que favorecem ou dificultam o acúmulo de gordura corporal (HÜLS et al., 2021). A obesidade está diretamente associada à redução da expectativa de vida, ao aumento da morbimortalidade e com aumentos dos custos para os sistemas público e privado de saúde. Apesar de muitas estratégias, como redução do consumo de calorias ou melhoria do metabolismo do indivíduo, terem sido desenvolvidas para combater a condição de sobrepeso e obesidade, estudos recentes mostram que tais intervenções, quando realizadas de forma imprudente, levam ao aparecimento de desordens físicas e mentais e não são tão efetivas à longo prazo (SALAS, 2015).

O estabelecimento de sobrepeso e obesidade é resultante de predisposição genética e influências ambientais. A descoberta de genes que regulam o ganho e perda de massa corporal permitiu a identificação de defeitos genéticos que levam a hiperfagia acompanhada de obesidade grave e de início precoce. Todavia, os genes conhecidos explicam apenas uma pequena parte dos casos na população geral. Os fatores ambientais tem maior contribuição para o estabelecimento da obesidade, como a oferta de alimentos, atividades de lazer, bem como fatores que concernem a disparidade socioeconômica, de raça e gênero (LORENZO, 2016). Apesar dessa maior influência de fatores socioambientais na etiologia da obesidade, poucas ainda são as medidas efetivas na diminuição da incidência e prevalência dessa doença.

1.3 Fisiopatologia da obesidade, estresse oxidativo e inflamação

A obesidade é resultante da interação do homem com o meio ambiente e seu estilo de vida, tendo também fatores genéticos como facilitadores dessa doença. Ademais, a ingestão e o gasto de energia são determinantes do balanço energético e equilíbrio de massa corporal. Grande parte do controle do gasto energético está fortemente associado aos mecanismos de controle de ingestão de alimentos do centro regulador da massa corporal e da adiposidade, localizado no hipotálamo (JIN et al., 2023).

A obesidade é uma doença primariamente relacionada com o desbalanço entre a ingestão e o gasto energético. Quando existe um superávit de energia, esse excedente pode ser armazenado no tecido adiposo (TA) e em órgãos não adiposos, como fígado, coração e pâncreas, na forma de glicogênio e triglicerídeos. O tecido adiposo pode ser subdividido em tecido adiposo branco (TAB), órgão endócrino ativo cuja função principal é o armazenamento de energia, mediada por leptina e grelina, e marrom (TAM), responsável pela termogênese e produção de calor após estímulo β -adrenérgico ou exposição ao frio (IBRAHIM, 2010; WEST-EBERHARD, 2019). Dentre esses dois subtipos de tecido adiposo, o TAM, que representa apenas 1 – 2%, desempenha papel crucial na manutenção da homeostase energética (JIN et al., 2023).

Nos últimos anos, chegou-se ao entendimento de que a função do tecido adiposo está para além do armazenamento de energia, estando também envolvido em processos metabólicos e fisiológicos referentes à regulação de pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogênese por meio da liberação de mediadores denominados de adipocitocinas (ZWICK et al., 2018). Todavia, o acúmulo de lipídeos em tecidos não adiposos pode resultar em hipóxia, disfunção tecidual, havendo infiltração de macrófagos e aumentando a inflamação, o estresse oxidativo e seus riscos associados (JIN et al., 2023).

Após a ingestão de uma dieta hipercalórica, estabelece-se um quadro de hipertrigliceridemia e um aumento na quantidade de ácidos graxos livres na circulação sanguínea, gerando um estado de estresse oxidativo, caracterizado pelo acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (FRANCISQUETI et al., 2017). Esse aumento de ácidos graxos livres na circulação também promove a expressão de fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e vimentina pela regulação de receptor ativado

por proliferador de peroxissoma (PPRA γ) que regulam não apenas o crescimento celular, mas também o estabelecimento de resistência insulínica e esteatose hepática (BODEN, 2011; HA et al., 2020; HURR et al., 2019).

O acúmulo excessivo de gordura no organismo acarreta à estimulação da adipogênese, hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos do TA. Essa condição altera e influencia no microambiente, podendo levar a hipóxia e maior estado inflamatório (JIN et al., 2023). Essa hipóxia no TA induz a expressão de fatores de transcrição, como o NF- κ B93, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (SUOLANG et al., 2019).

Na condição de sobrepeso ou obesidade em humanos, há a infiltração de macrófagos de perfil M1, pró-inflamatório, no TA, e secreção de interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PRADO et al., 2009a). Como agravantes desse quadro, o TA também libera a leptina, principal adipocitocina pró-inflamatória que, juntamente com TNF- α , IL-1 β , IL-6, resistina e fator de crescimento hepático (HGF), contribuem para a progressão da síndrome metabólica, condição conhecida pela desordem metabólica causada pela obesidade com envolvimento de intolerância à glicose, resistência insulínica, dislipidemia, hipertensão e risco cardiovascular aumentado (JIN et al., 2023).

Em resposta, citocinas anti-inflamatórias são secretadas pelos adipócitos, sobretudo adiponectina, que exerce um papel anorexígeno, além de aumentar a sensibilidade à insulina e inibir a inflamação vascular. No entanto, a produção desses mediadores diminui com o ganho de massa corporal, o que favorece o estabelecimento de um status de inflamação tecidual (JIN et al., 2023; SOWKA; DOBRZYN, 2021).

Nesse contexto, a atual farmacoterapia antiobesidade visa apenas impedir o acúmulo excessivo de lipídeos no organismo, seja atuando no hipotálamo, reduzindo a sensação de fome, ou impedindo a absorção de gorduras. Diante da relevância dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo na gravidade da obesidade e suas complicações, é crucial que a farmacoterapia antiobesidade vise, além da perda de gordura, o combate à inflamação e o estresse oxidativo tecidual.

1.4 Tratamento da obesidade

O tratamento da obesidade baseia-se em abordagens não medicamentosa, medicamentosa ou em associação. A terapia não medicamentosa baseia-se, sobretudo, no controle da dieta e na realização de atividade física, entretanto, torna-se difícil o seu sucesso com o presente modo de vida, levando em consideração a facilidade e o custo de alimentos com pouco teor nutritivo e com altos teores de açúcar e gorduras. Dessa forma, faz-se necessário que o controle de dieta e atividade física sejam acompanhados de tratamento farmacológico, visando potencializar os efeitos da mudança no estilo de vida dos pacientes obesos (HILLS; ANDERSEN; BYRNE, 2011). Os métodos de perda de massa corporal incluem, portanto, a prática de atividade física, mudanças na dieta, cirurgia bariátrica e intervenções medicamentosas.

Apesar de ser uma enfermidade metabólica conhecida há muito tempo pela comunidade científica, as opções farmacológicas para o tratamento da obesidade são limitadas e apresentam diversos efeitos colaterais. Além disso, as mudanças de estilo de vida e do hábito alimentar promovem resultados mais duradouros quando comparados ao tratamento farmacológico isolado (RADAELLI; PEDROSO; MEDEIROS, 2016).

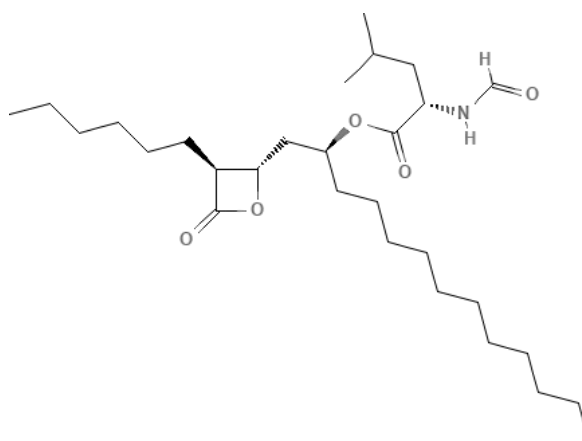
É importante salientar que o tratamento medicamentoso deve auxiliar o paciente na sua mudança de hábitos alimentares, e não apenas reduzir a sensação de fome e a ingestão de alimentos, o que tem sido um desafio constante na pesquisa. A terapia antiobesidade tradicional, resulta somente em 10% da perda de peso em média, reduzindo a adesão por parte dos pacientes e levando a consequências como o aumento de prescrições de medicamentos anti-hipertensivos, hipoglicemiantes e hipolipemiantes, condições normalmente associadas ao problema da obesidade (CHAKHTOURA et al., 2023; RADAELLI; PEDROSO; MEDEIROS, 2016).

Os atuais fármacos aprovados para tratamento da obesidade estão envolvidos na regulação de apetite e na inibição da absorção de gorduras no organismo. A sibutramina (Biomag[®]) é um fármaco anfetamínico que induz perda de massa corporal inibindo seletivamente a recaptação neuronal de serotonina e norepinefrina no hipotálamo, e em menor grau a recaptação de dopamina. Ela atua inibindo a ingestão de alimentos, aumentando a sensação de saciedade e reduzindo o apetite. Apesar de ser eficaz na redução da massa corporal, alguns efeitos colaterais são conhecidos, como boca seca, constipação, náusea, insônia e aumento da frequência cardíaca (TZOTZAS; KRASSAS; TZIOMALOS, 2009).

O tratamento com sibutramina é contraindicado para pacientes com hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, bem como para pacientes que fazem uso de fármacos com ação central, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina, metadona, lítio e inibidores da monoamina oxidase, por exemplo. Os efeitos colaterais dificultam a adesão e podem levar a descontinuidade do tratamento, que neste caso, pode fazer com que o paciente tenha um rápido ganho de massa corporal (TZOTZAS; KRASSAS; TZIOMALOS, 2009).

O orlistate (Xenical[®]) (figura 1) é um inibidor irreversível de lipases gástricas e pancreáticas e atua ligando-se covalentemente ao sítio ativo dessas enzimas no lúmen do trato gastrointestinal. Essa ligação impede que as enzimas lipases hidrolisem gorduras provenientes da dieta em ácidos graxos livres e monoglicerois. Assim, os triglicerídeos que não foram absorvidos são eliminados nas fezes. Portanto, a ação antiobesidade do orlistate está relacionada com a capacidade da substância de reduzir a absorção sistêmica de gorduras. O uso de orlistate influencia na escolha da dieta, uma vez que o consumo de alimentos ricos em gordura pode gerar severos efeitos adversos gastrointestinais, como diarreia e flatulências (HECK; YANOVSKI; CALIS, 2000b).

Figura 1 – Estrutura química do orlistate.



Fonte: Adaptado de (HECK; YANOVSKI; CALIS, 2000c).

Nos últimos anos, alguns fármacos utilizados no tratamento de diabetes tem sido redirecionados para o uso antiobesidade. Fármacos análogos de *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), como semaglutida (Ozempic[®]) e liraglutida (Saxenda[®]), mostraram ser efetivos na redução de 15,8% a 6,4% de massa corporal, respectivamente. Esse efeito é explicado pela menor absorção de calorias pelo efeito inibitório desses fármacos sobre o apetite e compulsão

alimentar, fazendo com que o indivíduo tenha preferência por alimentos com menor teor calórico. Entretanto, os efeitos colaterais e adversos como náusea, vômito, diarreia e aparecimento de cálculos biliares contribuem para a descontinuidade do tratamento (PEDROSA et al., 2022).

Tendo em vista essas limitações dos tratamentos farmacológico existentes para a obesidade, novos compostos tem sido pesquisados como antiobesidade, sobretudo aqueles cujas atividades antioxidante e antiinflamatória são conhecidas, uma vez que esses componentes também são de importância para a fisiopatologia da obesidade, desenvolvimento de dislipidemias e risco cardiovascular.

1.5 Produtos naturais como terapia antiobesidade

Diante dos impactos da obesidade e suas complicações na sociedade moderna, e os efeitos a curto, médio e longo prazo das terapias existentes, se faz necessária a busca por novos compostos antiobesidade. As substâncias com potencial a serem candidatas nessa terapia devem obedecer a três critérios importantes. Primeiro, ter eficácia clínica na redução de massa gordurosa corporal, na morbidade e mortalidade relacionadas à obesidade. Segundo, a relação risco-benefício deve ser favorável no que concerne o sucesso terapêutico. Por último, ser de fácil acesso, pois a disponibilidade de medicamentos são importantes fatores, uma vez que a obesidade é uma doença que atinge desproporcionalmente as classes sociais economicamente menos favorecidas (CHAKHTOURA et al., 2023).

Nesse contexto, o mercado das dietas e produtos naturais tem gerado campanhas para promover a redução do acúmulo de gorduras com menor esforço possível. Entretanto, estudos concluíram que a maioria das terapias complementares, principalmente aquelas que empregam compostos sintéticos, não obedece os critérios estabelecidos, sobretudo quanto a ocorrência de eventos adversos severos associadas ao uso de suplementos, como lesão hepática e morte (STICKEL; SHOUVAL, 2015). Desse modo, produtos naturais tem estado na vanguarda quanto ao seus usos como compostos farmacológicos promissores para desordens metabólicas.

As plantas são fontes de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, que na medicina popular e na etnobotânica são utilizadas desde as mais antigas civilizações para o

tratamento e prevenção de condições de saúde. Os usos empíricos dessas plantas foram transmitidos para grupos étnicos de acordo com a própria necessidade humana, o que na conjuntura moderna tem gerado uma série de instrumentos biotecnológicos com aplicações terapêuticas, dietéticas e diagnósticas. Nessa perspectiva, produtos vegetais têm ganhado cada vez mais destaque em virtude da grande variedade e da quantidade de substâncias com diferentes propriedades biológicas. Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, a bioprospecção de produtos naturais de origem vegetal torna-se um setor fundamental para o desenvolvimento tecnológico (SILVÉRIO et al., 2020).

Dentre as estratégias utilizadas na busca por moléculas promissoras, tem-se utilizado o docking molecular, uma ferramenta *in silico* capaz de avaliar a interação de ligantes com proteínas alvos importantes na fisiopatologia de doenças. Sendo assim, é possível a análise preditiva de compostos com potencial biotecnológico visando a interação com alvos proteicos envolvidos no desenvolvimento de patologias, como a obesidade (PINZI; RASTELLI, 2019).

1.6 A silimarina como ferramenta farmacológica

Tendo em vista a aplicação das plantas da flora brasileira com potencial biotecnológico, aplicação etnofarmacológica e de desenvolvimento de ferramentas farmacológicas, destaca-se a *Silybum marianum* L. (figura 2), espécie de planta medicinal popularmente conhecida como cardo mariano e cardo leite. É uma espécie integrante da família Asteraceae, sendo nativa do sul da Europa, sul da Rússia, Ásia Menor e norte da África que se adaptou ao norte e sul da América, bem como no sul da Austrália. Essa planta vem sendo utilizada há mais de 2000 anos pela medicina tradicional na alopátia e fitoterapia por suas atividades antioxidante e hepatoprotetora, principalmente (SAYIN et al., 2016; TAJMOHAMMADI; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2018).

Figura 2 – Silimarina (*Silybum marianum* L. Gaernt.).

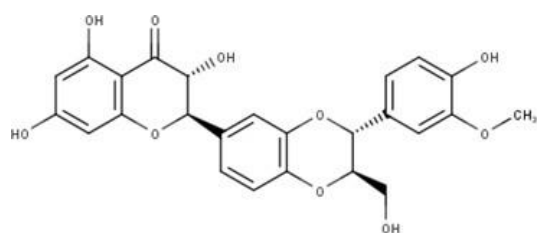


Fonte: (BIJAK, 2017).

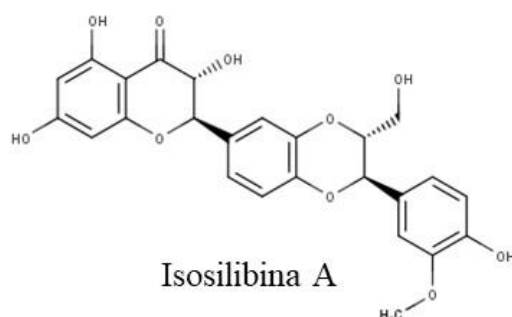
Essa planta ganhou proeminência na década de 60, quando pesquisadores isolaram seus principais constituintes ativos do extrato lipofílico, elucidando as estruturas químicas. Os principais componentes isolados e caracterizados estruturalmente da silimarina foram silibina (60%), silicristina (20%), silidianina (10%), isosilibina (5%) e taxifolina (1%) (figura 3) (NAVARRO et al., 2019; NI; WANG, 2016).

A silimarina é o principal componente extraído das sementes e frutos da *S. marianum* L. e apresenta diversas propriedades, dentre elas de impedir a peroxidação lipídica de membranas celulares e de organelas dos hepatócitos. Diversos estudos associam a atividade da silimarina na modulação da síntese de RNA mensageiro, o que aceleraria a síntese proteica, reduzindo os níveis séricos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e da biossíntese do colesterol, sobretudo reduzindo concentração dos níveis de colesterol biliar (NAVARRO et al., 2019; TAJMOHAMMADI; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2018).

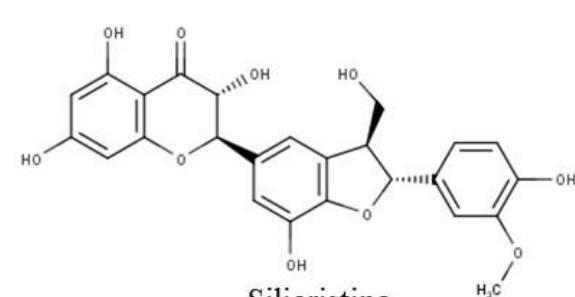
Além dessas propriedades, a silimarina apresenta outras ações farmacológicas, como colerética, anti-inflamatória, hipoglicêmica, antimicrobiana, antifibrótica, imunomodulatória e cardioprotetora. Ademais, estudos clínicos têm demonstrado eficácia da silimarina em diferentes doenças como sepse, osteoporose, aterosclerose, transtornos mentais e doenças de cunho metabólico, como a obesidade, firmando-se como um produto de origem natural com potencialidades biotecnológicas que ainda merecem ser exploradas (BORGES et al., 2016; STOLF; CARDOSO; ACCO, 2017).

Figura 3 – Principais componentes do extrato de silimarina (*S. marianum* L.).

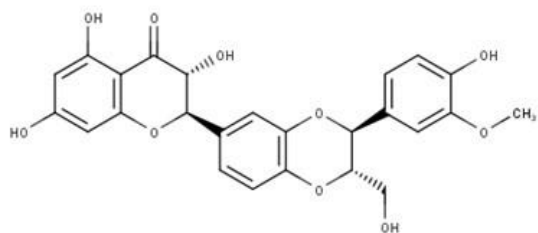
Silibina A



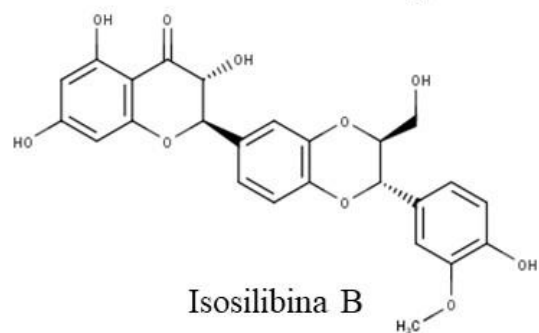
Isosilibina A



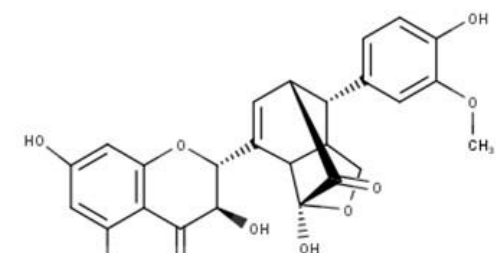
Silicristina



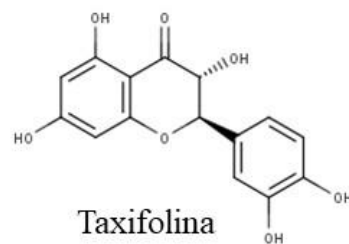
Silibina B



Isosilibina B



Silidianina



Taxifolina

Fonte: Adpatado de WADHWA et al., 2022.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Estudos epidemiológicos têm revelado que, devido ao número crescente de pessoas em condição de obesidade e sobrepeso, há também um consecutivo aumento de pacientes com síndrome metabólica e risco cardiovascular elevado (CABALLERO, 2019). Ademais, os fármacos utilizados na terapia antiobesidade apresentam eficácia limitada e um perfil de toxicidade relevante, o que favorece a descontinuidade do tratamento. Dessa forma, persiste relevante a busca por novos fármacos, sobretudo aqueles de origem natural e que possuam mecanismos que atuem na melhora da utilização dos lipídeos no organismo.

Nesse sentido, a prospecção de produtos naturais é um ponto importantíssimo na pesquisa de ferramentas farmacológicas e biotecnológicas em diversas áreas das ciências farmacêuticas. Logo, o presente trabalho reitera a importância em questão e ratifica a necessidade de investigar o potencial terapêutico da silimarina como agente contra a obesidade, visto que esta condição tem sido considerada como o maior fator de risco para a doença arterial coronariana, além de um grande impacto social e econômico decorrente dessa doença.

Destarte, a silimarina é um potencial candidato na terapia antiobesidade, visto que esta condição é intimamente relacionada com o estresse oxidativo, que culmina com o desenvolvimento da síndrome metabólica (DANTAS et al., 2018).

Adicionalmente, a silimarina é um extrato já utilizado em formas farmacêuticas comercializadas ao redor do mundo. Sua principal aplicação se dá apresentações orais voltadas para a hepatoproteção; no entanto, algumas outras indicações já são descritas, como suplemento dietético associado prevenção do envelhecimento ou até mesmo usado por atletas a fim de prevenir o estresse oxidativo.

Ademais, por ser um produto já comercializado mundialmente, com registro em órgãos sanitários, muitos estudos de eficácia e efetividade pré-clínica e clínica; além de estudos de segurança já comprovados em diferentes populações, o emprego da silimarina em modelo de obesidade possibilita uma maior possibilidade de aplicação real desse composto pela população, podendo contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população e diminuição dos impactos sociais, econômicos e de saúde relacionados com a obesidade.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial efeito da silimarina em modelo *in vivo* de obesidade, visando associar o estresse oxidativo e fenômenos inflamatórios com a deposição excessiva de gordura no organismo.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o efeito da silimarina nas alterações bioquímicas laboratoriais no perfil lipídico e hepático em animais submetidos à indução de obesidade por dieta hipercalórica.
- ✓ Correlacionar os possíveis efeitos antiobesidade com a melhora dos parâmetros de estresse oxidativo e histológico.
- ✓ Investigar o envolvimento do potencial anti-inflamatório e antioxidante da silimarina com o efeito antiobesidade.
- ✓ Investigar a interação teórica dos componentes da silimarina com enzima lipase pancreática.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise experimental *in vivo*

4.1.1 Animais e aspectos éticos

Os procedimentos com animais foram realizados no Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT/UFC), pertencente à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos pesando entre 18 e 22g, provenientes do Biotério Prof. Eduardo Torres da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos sob temperatura média de 22 ± 2 °C, com umidade relativa de $50 \pm 10\%$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas com iluminação artificial.

Todos os protocolos experimentais realizados atenderam os preceitos éticos nacionais (definidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA) e internacionais referentes à pesquisa em experimentação com animais. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo nº 9214030622 (Anexo I).

4.1.2 Produção da ração hipercalórica

No modelo experimental, foram fornecidos dois tipos de ração para os animais: ração padrão (RP) e ração hipercalórica (RH) para indução da obesidade nos animais. A composição nutricional das duas rações está apresentada na tabela 1.

A dieta hipercalórica foi produzida de acordo com o padronizado por Estadella *et al.* (2004), sendo composta por ração padrão, chocolate ao leite, amendoim torrado e biscoito de amido de milho na proporção 3:2:2:1. Todos os componentes foram triturados e misturados em batedeira industrial até homogeneização. Posteriormente, a massa foi extrusada para confecção dos *pellets*, para obtenção de formato similar ao da ração padrão. Até o momento do uso, a RH foi armazenada em temperatura entre 2 e 8 °C.

Os procedimentos para a confecção dos *pellets* de ração hipercalórica foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia/UFC, sob a orientação do Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

Tabela 1 – Composição nutricional das rações padrão e hipercalórica.

Componente nutricional	Ração padrão (RP)	Ração hipercalórica (RH)
Carboidratos	56%	48%
Proteínas	19%	20%
Lipídeos	3,5%	20%
Vitaminas e minerais	5%	5%
Celulose	4,5%	4%
Umidade	12%	3%
Teor energético	4,07 kcal/g	5,11 kcal/g

Fonte: ESTADELLA et al., 2004.

4.1.3 Avaliação do efeito antiobesidade da silimarina em camundongos

Camundongos C57BL/6 machos foram aclimatados durante uma semana recebendo água e ração padrão *ad libitum*. Ao atingirem a massa corpórea entre 18 e 22 g, foram divididos em 7 grupos (n = 10 por grupo, sendo cada grupo aclimatado em caixas contendo 5 animais), conforme descrito na quadro 1. Para as preparações de silimarina (Sigma-Aldrich catálogo n° S0292) e orlistate (Sigma-Aldrich catálogo n° PHR1445), utilizou-se solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (salina) como veículo.

Conforme apresentado na figura 4, após período de aclimação, os animais receberam RP ou RH durante 55 dias. O tratamento com veículo, orlistate ou silimarina iniciou no 6° dia após a oferta de RH, sendo realizada por 50 dias consecutivos. Diariamente, a massa corporal dos animais foi medida, assim como o consumo médio de água e ração de cada grupo.

Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados (cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg), eutanasiados e submetidos à técnica cirúrgica para remoção de tecido adiposo e hepático, além de amostras de sangue em tubos heparinizados para obtenção do plasma. As amostras teciduais foram pesadas e seccionadas ao meio, sendo uma seção para análise histológica e outra, armazenada em freezer -80 °C para mensuração de marcadores de estresse oxidativo.

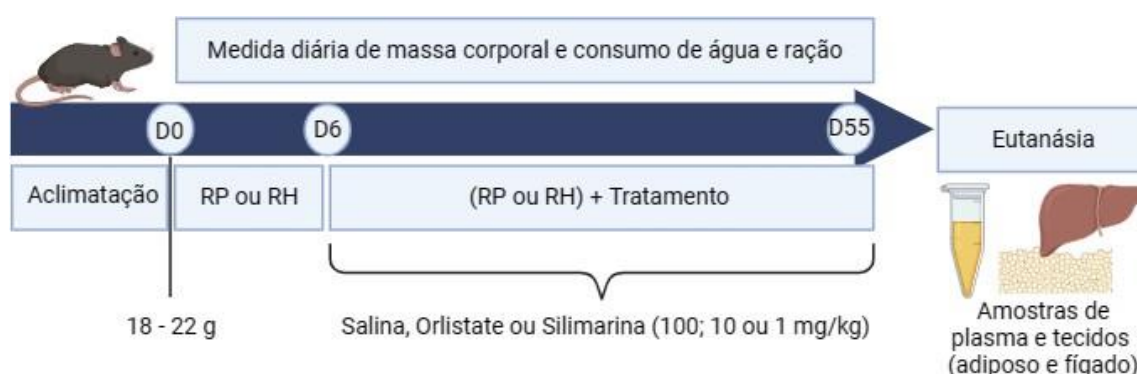
Quadro 1 – Grupos experimentais.

Grupo experimental	Sigla	Procedimento
Controle	CT	RP + veículo por via oral (v.o.)
Silimarina	S100	RP + silimarina 100 mg/kg (v.o.)
Obesidade	RH	RH + veículo por via oral (v.o.)
Orlistate	RH + Or1	RH + orlistate 30 mg/kg por via oral (v.o.)
Silimarina 100	RH + S100	RH + silimarina 100 mg/kg por via oral (v.o.)
Silimarina 10	RH + S10	RH + silimarina 10 mg/kg por via oral (v.o.)
Silimarina 1	RH + S1	RH + silimarina 1 mg/kg por via oral (v.o.)

Legenda: RP: ração padrão; RH: ração hipercalórica; Or1: orlistate 30 mg/kg (LEE et al., 2019); S: silimarina.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4 – Linha do tempo do modelo de indução de obesidade em camundongos C57BL/6.



Fonte: elaborado pelo autor pelo software Biorender.

4.1.4 Análise de marcadores bioquímicos plasmáticos

Para determinação de colesterol total (Ct), triglicerídeos (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), as amostras de sangue foram colhidas em eppendorf contendo heparina sódica (5000 UI/mL) e centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos). Então, o plasma foi separado e congelado a -20°C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade das variáveis analisadas.

As quantificações dos analitos foram realizadas utilizando-se kit's enzimáticos colorimétricos (Labtest[®] e Bioclin[®]), seguindo as recomendações dos fabricantes, utilizando

espectrofotômetro semi-automático Labquest®.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LabTOX) e Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

4.1.5 Lipídios totais e triglicerídeos em tecidos adiposo e hepático

Amostras de tecido adiposo e hepático (100 mg) foram homogeneizadas em solução de clorofórmio:metanol:água (na proporção de 2:2:1) e mantidas sob agitação. Após centrifugação (200g/2 minutos), 500 µL da fase orgânica foi transferida para um tubo previamente pesado. A massa de lipídeos totais foi obtida pela diferença entre a massa do tubo antes e após a evaporação do solvente. Então, o conteúdo lipídico foi solubilizado em isopropanol puro e os níveis de Tg foram determinados por método colorimétrico (Labtest®) e expressos como mg de Tg/g de tecido (SAINI et al., 2021).

4.1.6 Análise de marcadores de estresse oxidativo

As amostras de tecidos congelados foram pesadas e homogeneizadas em solução fosfato tamponada (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4). Todo o conteúdo foi transferido para eppendorf, centrifugado (1000 g/10 minutos/4°C) e o sobrenadante utilizado para os ensaios (MANCINI, 2013).

4.1.6.1 Dosagem de proteínas totais

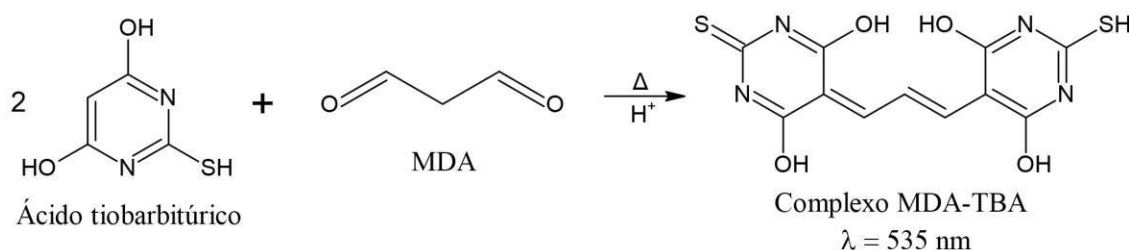
O método de determinação de proteínas de Bradford consiste em reação colorimétrica em que proteínas presentes na amostra se ligam ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, em meio ácido, induzindo alteração da cor marrom para a cor azul, devido a presença da forma aniônica do corante. Sendo assim, a intensidade da cor é proporcional ao teor de proteína (BRADFORD, 1976).

Para isso, em uma microplaca foram adicionados 150 μL do reagente de Bradford e 5 μL das amostras dos homogenatos de tecido adiposo e hepático. A curva padrão foi feita com solução de albumina de soro bovino (BSA). As leituras foram realizadas por espectrofotometria a 595 nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.1.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Malonildialdeído (MDA) é o principal produto de peroxidação lipídica e representante das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) – TBARS. A reação leva a formação de MDA-TBA, produto com coloração rosa cuja intensidade pode ser mensurada por espectrofotometria, conforme mostra a figura 5 (LEON; BORGES, 2020).

Figura 5 – Reação de detecção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).



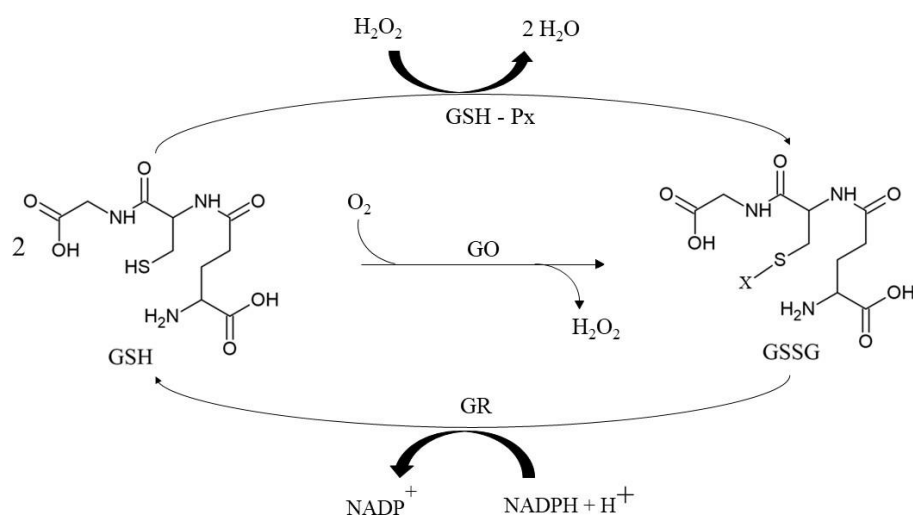
Fonte: MIHARA; UCHIYAMA; FUKUZAWA, 1980.

Para essa análise, transferiu-se para eppendorf 125 μL dos homogenatos e adicionou-se 750 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1% e 250 μL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 100 $^\circ\text{C}$ por 60 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas (2000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante foi separado para a realização da leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de TBARS por miligrama de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.1.6.3 Glutationa reduzida (GSH)

A glutatona na sua forma reduzida (GSH), em condições de estresse oxidativo, é convertida a GSSG. Esse processo pode ser revertido pela ação da enzima glutatona redutase (GR) (figura 6). As medidas dos níveis de GSH e GSSG (razão GSH/GSSG) são úteis para a avaliação de estresse oxidativo tecidual, uma vez que, nessas situações, ocorre depleção dos estoques de GSH (GIUSTARINI et al., 2011).

Figura 6 – Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida e oxidada.



Legenda: Glutationa reduzida (GSH); Glutationa oxidada (GSSG) – duas moléculas de glutatona associadas por ligação de sulfeto (SX); Glutationa redutase (GR); Glutationa oxidase (GO); Glutationa peroxidase (GSH-Px).

Fonte: Adaptado de SAMPAIO, 2016.

Buscando-se medir os níveis teciduais de GSH, 100 μ L de homogenato foram adicionados a 80 μ L de água destilada e 20 μ L de ácido tricloroacético a 50%. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, retirou-se 100 μ L do sobrenadante e adicionou-se a 200 μ L de tampão tri-hidroximetil-aminometano (Tris) 0,4 M (pH 8,9). Então, adicionou-se 10 μ L do reagente cromogênico ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M. As amostras foram homogeneizadas e, após 3 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de GSH por miligrama de proteína (μ g/mg) (SAMPAIO, 2016).

4.1.6.4 Atividade relativa da superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui uma defesa antioxidante catalisando a dismutação dos radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O método para determinação dos níveis de SOD envolve a formação da hidroxibenzoquinona, formada a partir da oxidação do pirogalol pelos ânions superóxidos, e, conseqüentemente, do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), de tal forma que a intensidade da cor é inversamente proporcional a atividade enzimática de SOD (SIQUEIRA, 2021).

Com essa finalidade, em microtubo, adicionou-se 99 µL de solução tampão fosfato (pH 7,4), 6 µL de solução de MTT 1,25 mmol/L, 15 µL de pirogalol a 0,1 mmol/L e 30 µL do homogenato. A mistura foi incubada a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 150 µL de dimetilsulfóxido e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína (U/mg) (LOWRY et al., 1951).

4.1.7 Análise de marcadores inflamatórios

O níveis de adiponectina do tecido adiposo (Millipore – Cat. EZMADP – 60K) e níveis de interleucina-1β (IL-1 β) (BD OptEIA – Cat. 557953) em homogenatos foram mensurados utilizando kit's comerciais de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis dos marcadores inflamatórios foram expressos como ng/mg de proteína e pg/mg de proteína para adiponectina e IL-1β, respectivamente.

4.1.8 Análise histológica

Os tecidos adiposo e hepáticos foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 e 48 h, respectivamente, e em seguida, conservados em solução etanólica a 70%. O processamento histológico, corte em micrótomo, coloração e avaliação histológica foram feitos no Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas (HISTOVESP) da Universidade Estadual do Ceará, conforme Manual de Técnica Histológica de Rotina e Colorações de Santos *et al.*, 2021.

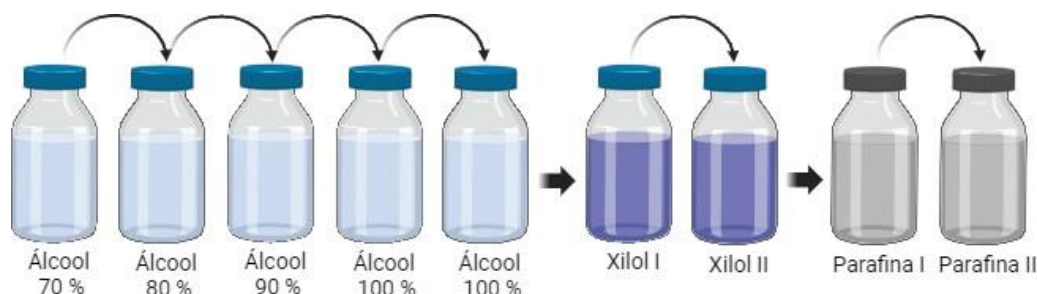
O processamento histológico consiste em tratamento químico que objetiva tornar os fragmentos de tecido rígidos para facilitar a obtenção de cortes finos, que serão

posteriormente observados em microscópio. Nesse processo, os tecidos passam por etapas de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão (figura 7).

A desidratação é realizada pela imersão dos tecidos em soluções alcoólicas em concentrações graduais (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 hora em cada, sendo repetida a imersão em álcool absoluto. Esse processo tem por finalidade a retirada de água para não interferir na impregnação pela parafina. Em seguida, é realizada a diafanização ou clarificação dos tecidos. Essa etapa visa a remoção do álcool residual e sua completa substituição pelo xilol, substância miscível com etanol (agente desidratante) e com a parafina (agente impregnador). Para isso, os tecidos foram imersos em xilol (xilol I e xilol II) por 1 hora cada.

Após diafanizadas, as amostras foram impregnadas com parafina líquida para que se tornassem rígidas e fáceis de cortar. A impregnação com parafina elimina o xilol das amostras teciduais e permite sua penetração nos espaços antes ocupados por água ou gordura. Dessa forma, as amostras foram imersas em parafina (parafina I e parafina II) em estufa a 60°C.

Figura 7 – Esquema de processamento histológico.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2021 (biorender).

4.1.8.1 Processo de inclusão e microtomia dos tecidos hepáticos e adiposo

Posteriormente, foi realizado o procedimento de inclusão que consiste em transferir os tecidos para moldes onde serão envolvidos por parafina líquida. Após resfriamento, os blocos de parafina com os tecidos incluídos foram obtidos. Então, foi realizada a microtomia, para obtenção de cortes finos dos tecidos. Esses cortes foram colocados em banho (50°C) para distensão da parafina, evitando dobras nos tecidos. Os cortes foram postos em lâminas e colocadas em estufa (60°C por 2 horas).

4.1.8.2 Coloração histológica com hematoxilina e eosina (H.E.)

Para realizar a coloração dos tecidos com o corante hematoxilina e eosina, as amostras foram desparafinizadas (imersão em xilol I e xilol II por 10 minutos cada), seguida de hidratação em que as amostras foram imersas em soluções decrescentes de álcool etílico (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, 80%, 70% e água destilada por 1 minuto cada).

Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e tratadas com hematoxilina por 3 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas com água destilada e corada com eosina (imersas durante 7 minutos). As amostras foram desidratadas, clarificadas e levadas para análise ao microscópio.

4.1.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no programa *GraphPad Prism 5.0* e expressos como média \pm erro padrão da média. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foram performadas análise de variância *one-way* e *two-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnett e correlação de Pearson, adotando-se como critério de significância $p < 0,05$.

4.2 Docking molecular

4.2.1 Preparação dos ligantes e receptor

As estruturas químicas da isosilibina A (CID11059920), isosilibina B (CID10885340), silibina A (CID31553), silibina B (CID1548994), silicristina (CID441764), silidianina (CID11982272), taxifolina (CID439533) e orlistate (CID 303410) foram obtidas no repositório PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). As estruturas tridimensionais em pH fisiológico foram obtidas utilizando o software MarvinSketch (CSIZMADIA, 1999) e otimizadas no software Avogadro (HANWELL et al., 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest descente* com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (HALGREN, 1996; MARINHO et al., 2021).

Para investigar as possíveis interações dos compostos frente à lipase pancreática, a estrutura cristalográfica do “Complexo lipase pancreática colipase inibida por ácido metoxiundecilfosfínico (MUP) com resolução de 2,46 angstroms” (PDB ID: 1LPB) foi obtida

do repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) (EGLOFF et al., 1995). Na etapa de preparação da estrutura da enzima foram removidos os interferentes (moléculas de água, íons e outras moléculas co-cristalizadas), adicionados os hidrogênios polares, cargas Kollman e cargas Gasteiger utilizando o software Autodocktools™ (TROTT; OLSON, 2010).

4.2.2 Condições das simulações

O docking molecular foi executado utilizando o software AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) e *Exhaustiveness* 64 (MENDES et al., 2023). O *grid box* foi centralizado de maneira a envolver toda a estrutura da enzima (-6.389 x, 29.851 y, 38.483 z) e *size* (114 x, 94 y, 110 z). O protocolo foi validado através do redocking com o inibidor co-cristalizado MUP. Foram realizadas 50 simulações independentes, gerando 20 poses cada. Na seleção das melhores poses, foram utilizados os critérios estatísticos RMSD < 2,0 Å (*Root Mean Square Deviation*) (YUSUF et al., 2008) e valores de energia de afinidade iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FOERSTER, 2014; SILVA et al., 2021).

Para identificação das distâncias e tipos de interação intermoleculares com os resíduos de aminoácidos, os dados foram analisados utilizando os softwares UCSF Chimera™ (PETTERSEN et al., 2004), *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016), *Pymol* (SEELIGER; DE GROOT, 2010), e o servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (ADASME et al., 2021; SALENTIN et al., 2015).

RESULTADOS

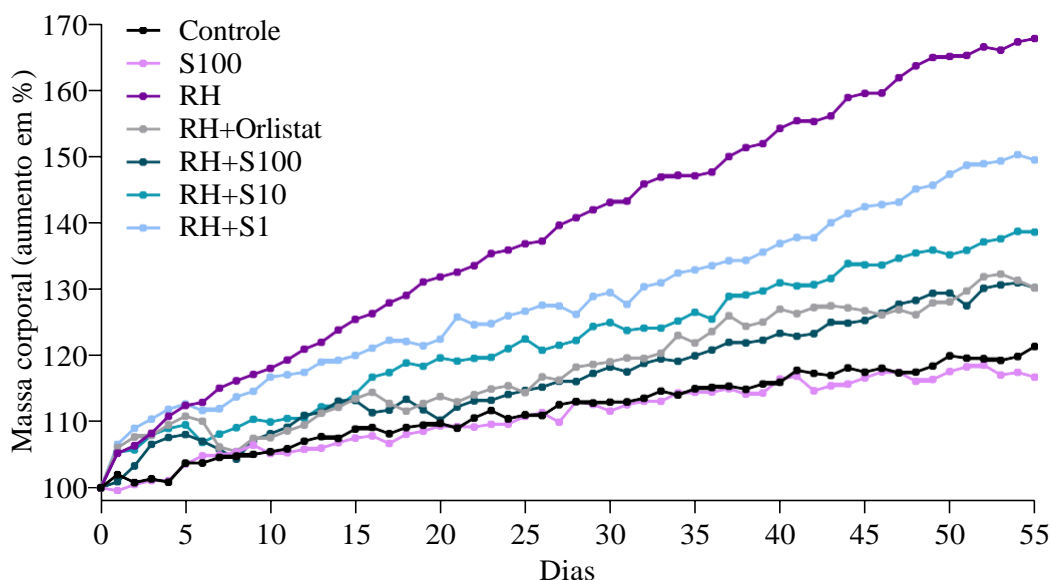
5 RESULTADOS

5.1 Análise do modelo de indução de obesidade

5.1.1 Massa corporal de camundongos C57BL/6

A ração hipercalórica foi capaz de induzir obesidade em camundongos C57BL/6, confirmada pelo aumento da massa corporal dos animais que receberam a ração hipercalórica (RH) em comparação aos animais que receberam ração padrão. Não foi observada variação de massa corporal nos animais que receberam somente silimarina, em comparação ao grupo controle. Os grupos tratados com silimarina 100 mg/kg e orlistate 30 mg/kg (RH + S100 e RH + Orl) começaram a apresentar diferença de massa corporal em relação ao grupo obesidade (RH) no dia 7, e esse efeito se manteve até o final do experimento. O grupo tratado com silimarina nas doses de 10 e 1 mg/kg (RH + S10 e RH + S1) apresentaram diferença a partir do dia 10 e 22, respectivamente, conforme mostra a figura 8.

Figura 8 – Evolução da massa corporal de camundongos C57BL/6 durante modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



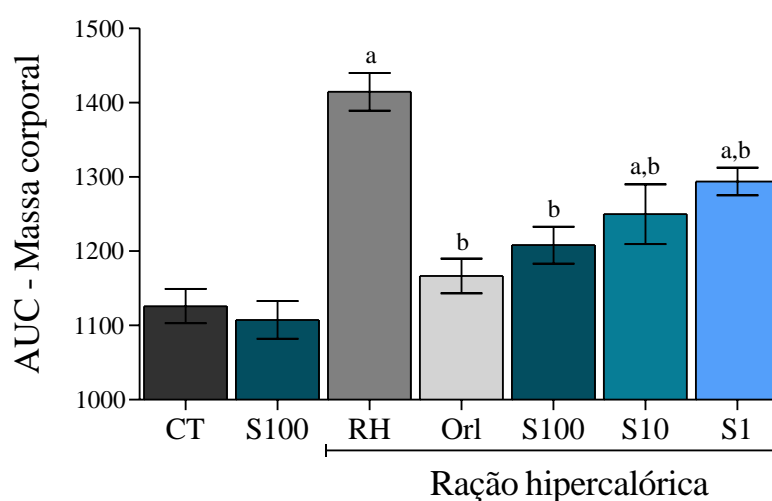
Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM da variação percentual de massa corporal em comparação ao primeiro dia do experimento. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *two-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/kg).

Fonte: elaborado pelo autor.

Para confirmar o efeito antiobesidade observado na figura anterior, a área sob a curva (AUC) da massa corporal dos animais submetidos ao modelo experimental foi calculada.

Como demonstrado na figura 9 e na tabela 2, os animais alimentados com RH apresentaram AUC superior ($1.415 \pm 25,5$) quando comparados aos animais do grupo controle ($1.126 \pm 23,1$). Os valores de AUC encontrados para os animais tratados com orlistate e silimarina (100 mg/kg) demonstraram que essas substâncias foram capazes de impedir completamente o aumento do ganho de peso induzido pela RH. Adicionalmente, o tratamento com silimarina, nas doses de 10 e 1 mg/kg, reduziu parcialmente a AUC.

Figura 9 – Área sob a curva (AUC) da evolução da massa corporal de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica.



Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^a $p < 0,05$ vs. grupo CT; ^b $p < 0,05$ vs. grupo RH. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Valores de AUC da evolução de massa corporal de camundongos C57BL/6 durante modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Grupo	AUC (unidades arbitrárias)
CT	$1.126 \pm 23,1$
S100	$1.108 \pm 25,4$
RH	$1.415 \pm 25,5^a$
RH + Orl	$1.167 \pm 23,3^b$
RH + S100	$1.208 \pm 24,9^b$
RH+ S10	$1.250 \pm 40,2^{a,b}$
RH + S1	$1.294 \pm 18,5^{a,b}$

Legenda – Os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^a $p < 0,05$ vs. CT; ^b $p < 0,05$ vs. grupo RH. Fonte: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, na tabela 3 estão apresentados os valores de massa corporal no primeiro e último dia do modelo experimental, além da variação absoluta e percentual da massa corporal. Para otimizar a comparação entre os grupos, os animais foram divididos de forma a não apresentarem diferença significativa de massa corporal entre os grupos no início do experimento. Ao final de 55 dias, os animais do grupo obesidade (RH) apresentaram variação de $12,5 \pm 0,5$ g, equivalente a quase 70% de aumento. Em comparação, o grupo controle (CT) apresentou aumento de massa corpórea menor ($3,9 \pm 0,3$, cerca de 21,3 %). Como observado na tabela, o grupos RH + Orl e RH + S100 preveniram o aumento de massa corporal em quase 40%, enquanto que os grupos RH + S10 e RH + S1 reduziram esse aumento em aproximadamente 29 e 19%, respectivamente.

Tabela 3 – Variação de massa corporal dos camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica ao início e fim do experimento.

Grupo	Massa corporal (g)		Variação de massa (g)	
	Inicial (dia 0)	Final (dia 55)	Absoluta (g)	Relativa (%)
CT	$18,3 \pm 0,3$	$22,2 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,3$	$21,3 \pm 1,4$
S100	$18,2 \pm 0,4$	$21,2 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,3$	$16,7 \pm 1,4$
RH	$18,5 \pm 0,4$	$31,1 \pm 0,7$	$12,5 \pm 0,5^a$	$67,7 \pm 2,5^a$
RH + Orl	$18,0 \pm 0,4$	$23,4 \pm 0,7$	$5,4 \pm 0,4^b$	$30,2 \pm 1,7^b$
RH + S100	$18,8 \pm 0,4$	$24,5 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,2^b$	$30,1 \pm 1,1^b$
RH+ S10	$18,6 \pm 0,6$	$25,8 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,3^{a,b}$	$38,5 \pm 1,4^{a,b}$
RH + S1	$18,4 \pm 0,4$	$27,4 \pm 0,6$	$9,1 \pm 0,4^{a,b}$	$49,4 \pm 2,5^{a,b}$

Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. grupo CT; ^bp<0,05 vs. grupo RH.

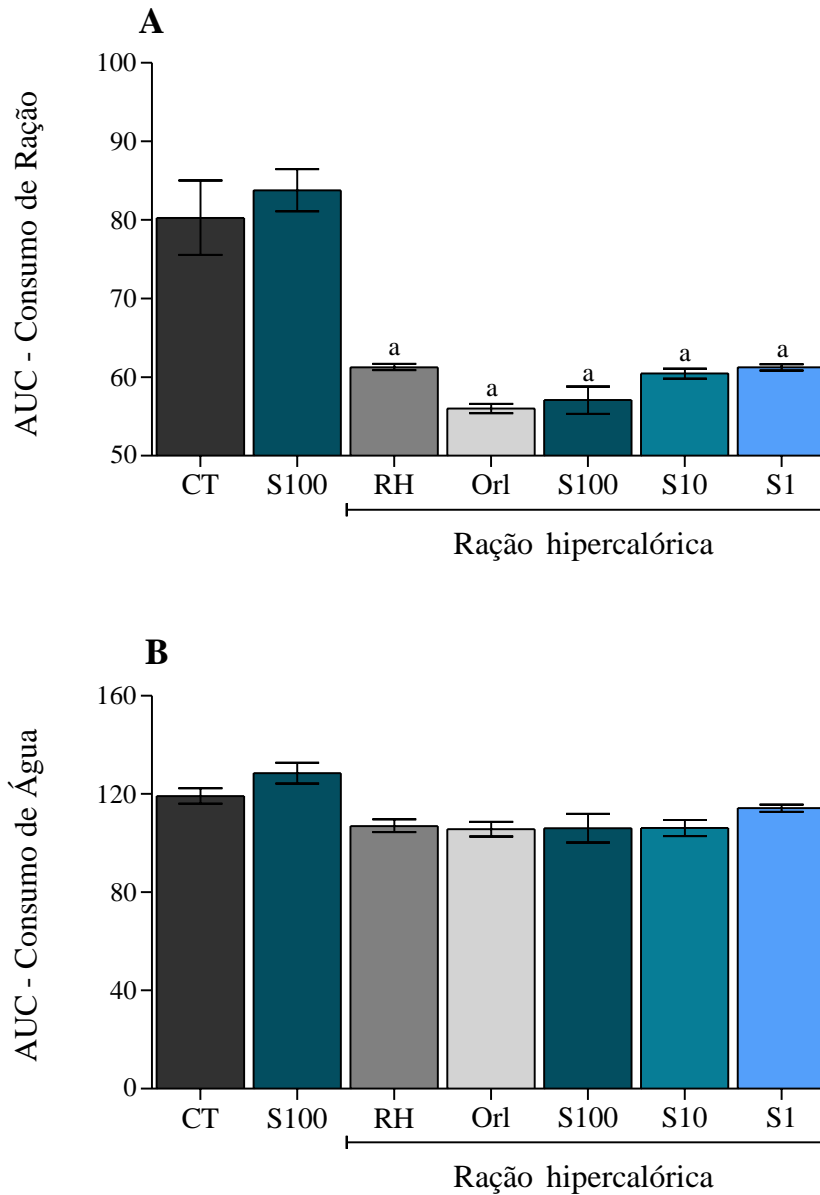
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.2 Consumo de ração e água de camundongos durante modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica

A inserção da dieta hipercalórica para a indução de obesidade nos animais reduziu o consumo de ração, mas não afetou o consumo de água. O consumo médio de ração do grupo controle (ração padrão) apresentou área sobre a curva de $80,29 \pm 4,74$, observando-se uma redução significativa dos grupos que receberam RH, com valores de área sobre a curva que variou de $56,04 \pm 0,58$ a $61,29 \pm 0,38$. O consumo de água apresentou área sob a curva que

variou entre $105,6 \pm 3,05$ e $128,5 \pm 4,31$, conforme apresentado na figura 10 e tabela 4.

Figura 10 – Área sob a curva (AUC) do consumo de ração e de água de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade por dieta hipercalórica.



Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett (^a $p < 0,05$ vs. grupo CT).

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Área sob a curva do consumo médio de ração e água de camundongos C57BL/6 em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Grupo	Consumo de ração (AUC)	Consumo de água (AUC)
CT	80,29 ± 4,74	119,2 ± 3,15
S100	83,77 ± 2,70	128,5 ± 4,31
RH	61,29 ± 0,38 ^a	107,0 ± 2,60
RH + OrI	56,04 ± 0,58 ^a	105,6 ± 3,05
RH + S100	57,09 ± 1,73 ^a	106,1 ± 5,86
RH+ S10	60,47 ± 0,65 ^a	106,2 ± 3,31
RH + S1	61,27 ± 0,40 ^a	114,2 ± 1,48

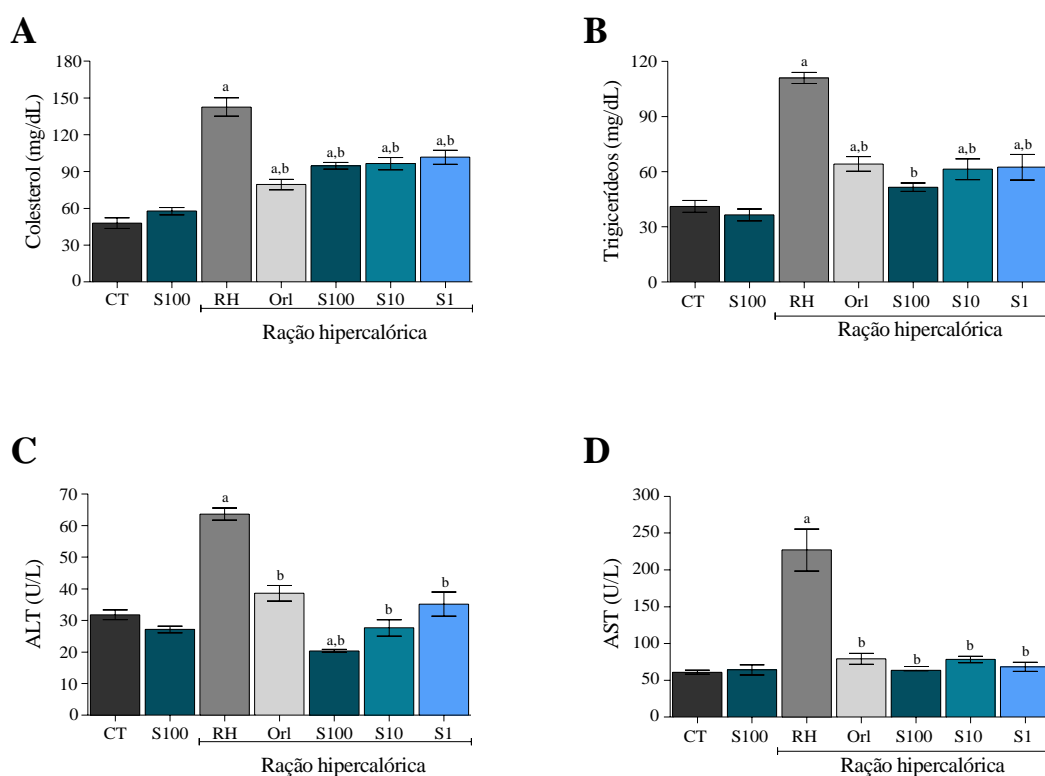
Legenda – os resultados estão expressos como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett (^ap<0,05 vs. grupo CT). CT = controle; RH = ração hipercalórica; OrI = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3 Marcadores bioquímicos plasmáticos

A partir das amostras de plasma, foram mensurados os níveis de colesterol total (Ct), triglicérides (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (tabela 5), para avaliação do metabolismo lipídico e da função hepática. Todas as doses de silimarinas foram capazes de reduzir os níveis de Ct em comparação ao grupo RH (142,6 ± 7,6) em aproximadamente 36% (Figura 11A). Quanto aos níveis de Tg, o grupo tratado com silimarina 100 mg/kg reduziu completamente (51,5 ± 2,3) em relação ao grupo RH (111,1 ± 3,0), não apresentando diferença do grupo CT (41,0 ± 3,2). Os grupos tratados com silimarina, nas doses de 10 e 1 mg/kg, também reduziram os níveis de Tg em relação ao grupo RH (Figura 11B).

Em relação aos níveis de ALT e AST, o tratamento de silimarina preveniu completamente o aumento dos marcadores de dano hepático. O grupo RH apresentou valores superiores de ALT (63,7 ± 1,9 U/L) e AST (227,1 ± 28,4 U/L), em relação ao grupo CT (31,8 ± 1,5 U/L) e (61,2 ± 2,6 U/L), respectivamente. O tratamento com silimarina, em todas as doses testadas, preveniu o aumento de ALT e AST, apresentando valores equiparados ao grupo CT (Figura 11C e D).

Figura 11 – Marcadores bioquímicos plasmáticos de camundongos submetidos ao modelo de obesidade.



Legenda – os resultados estão expressos como média ± EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. grupo CT; ^bp<0,05 vs. grupo RH. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Níveis plasmáticos de colesterol total (Ct), triglicerídeos (Tg), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Grupo	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
CT	47,9 ± 4,3	41,0 ± 3,2	31,8 ± 1,5	61,2 ± 2,6
S100	57,7 ± 2,9	36,4 ± 3,3	27,2 ± 1,0	64,3 ± 6,7
RH	142,6 ± 7,6 ^a	111,1 ± 3,0 ^a	63,7 ± 1,9 ^a	227,1 ± 28,4 ^a
RH + Orl	79,4 ± 4,3 ^{a,b}	64,2 ± 4,0 ^{a,b}	38,6 ± 2,5 ^b	79,2 ± 7,4 ^b
RH + S100	94,7 ± 2,6 ^{a,b}	51,5 ± 2,3 ^b	20,3 ± 0,5 ^{a,b}	63,7 ± 0,7 ^b
RH+ S10	96,3 ± 5,1 ^{a,b}	61,3 ± 5,6 ^{a,b}	27,7 ± 2,6 ^b	78,5 ± 4,3 ^b
RH + S1	101,6 ± 5,8 ^{a,b}	62,4 ± 7,0 ^{a,b}	35,2 ± 3,8 ^b	68,3 ± 6,2 ^b

Legenda – os resultados estão expressos como média ± EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. grupo CT; ^bp<0,05 vs. grupo RH. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.4 Massa e conteúdo lipídico dos tecidos adiposo e hepático

Ao final dos 55 dias do modelo, os tecidos hepático (figura 12A) e adiposo (figura 12B) dos animais foram separados, pesados e foi mensurado o conteúdo lipídico. Observou-se que os grupos tratados com silimarina nas 3 doses apresentaram redução da massa de tecido adiposo abdominal, com valores entre 1,11 a 1,14 g, em comparação ao grupo obesidade ($2,38 \pm 0,17$ g), redução de aproximadamente 55% do tamanho do tecido. Quanto à massa do tecido hepático (tabela 6 e figura 13), todas as doses testadas de silimarina apresentaram diferença da massa em comparação ao grupo obesidade. Outrossim, as doses de 100 e 10 mg/kg não apresentaram diferença em comparação ao grupo controle.

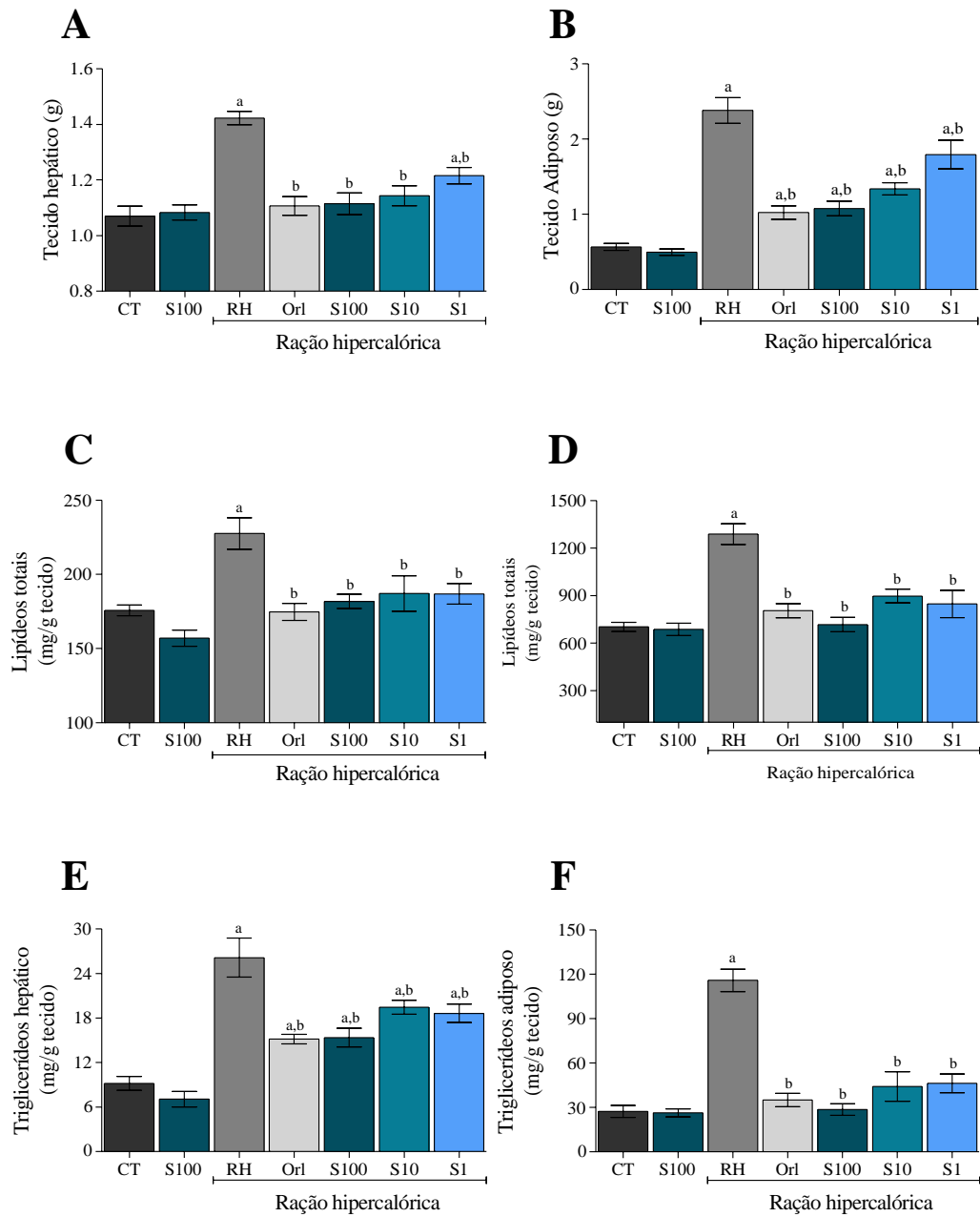
Todos os grupos tratados com silimarina apresentaram redução dos lipídeos totais em relação ao grupo RH ($1.288 \pm 65,3$ e $227,5 \pm 10,7$; nos tecidos adiposo e hepático, respectivamente), não havendo diferença com o grupo controle. Além disso, no tecido adiposo, o tratamento com silimarina reduziu a deposição de triglicerídeos (Tg) com valores entre 28 a 46 mg/g tecido, enquanto o grupo obesidade apresentou $116,0 \pm 7,5$ mg/g tecido. No tecido hepático, a silimarina reduziu a deposição de Tg, em comparação ao grupo RH, conforme mostrado na figura 13 e tabela 6.

Figura 12 – Tecidos hepático (A) e adiposo (B) de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo experimental de obesidade.



Legenda – CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg).

Figura 13 – Massa, lipídeos totais e triglicéridos de tecido hepático (A, C e E) e adiposo (B, D e F) de camundongos C57BL/6 em modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. controle; ^bp<0,05 vs. grupo RH.

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Valores das massas, lipídeos totais e triglicerídeos dos tecidos hepático e adiposo dos camundongos submetidos ao modelo de obesidade.

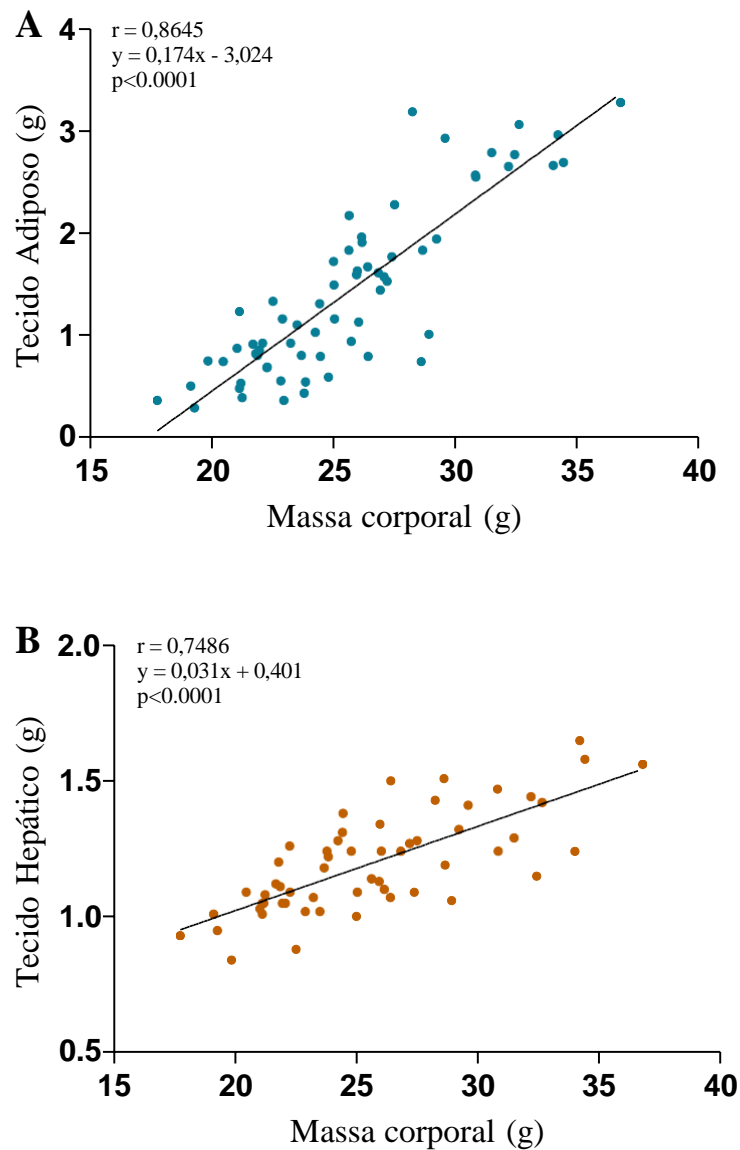
Grupo	Massa dos tecidos (g)		Lipídeos totais (mg/g tecido)		Triglicerídeos (mg/g tecido)	
	Adiposo	Hepático	Adiposo	Hepático	Adiposo	Hepático
	CT	0,56 ± 0,05	1,07 ± 0,03	703,3 ± 28,9	175,8 ± 3,6	27,3 ± 4,0
S100	0,49 ± 0,04	1,08 ± 0,03	687,8 ± 39,5	157,0 ± 5,5	26,4 ± 2,7	7,1 ± 1,0
RH	2,38 ± 0,17 ^a	1,42 ± 0,02 ^a	1.288 ± 65,3 ^a	227,5 ± 10,7 ^a	116,0 ± 7,5 ^a	26,1 ± 2,6 ^a
RH + Orl	1,02 ± 0,09 ^{a,b}	1,11 ± 0,03 ^b	805,1 ± 43,9 ^b	174,9 ± 5,7 ^b	35,1 ± 4,5 ^b	15,1 ± 0,6 ^{a,b}
RH + S100	1,08 ± 0,09 ^{a,b}	1,11 ± 0,04 ^b	716,6 ± 46,1 ^b	181,8 ± 4,8 ^b	28,7 ± 4,0 ^b	15,3 ± 1,3 ^{a,b}
RH+ S10	1,34 ± 0,08 ^{a,b}	1,14 ± 0,03 ^b	897,5 ± 43,0 ^b	187,2 ± 12,0 ^b	44,2 ± 10,0 ^b	19,5 ± 0,9 ^{a,b}
RH + S1	1,79 ± 0,19 ^{a,b}	1,22 ± 0,03 ^{a,b}	846,9 ± 86,2 ^b	187,0 ± 7,0 ^b	46,3 ± 6,2 ^b	18,6 ± 1,2 ^{a,b}

Legenda – os resultados estão expressos como média ± EPM. A comparação dos grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. controle; ^bp<0,05 vs. grupo RH. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.5 Correlação entre massa corpórea e tamanho tecidual

A correlação de Pearson foi aplicada para verificar a existência de relação linear entre os valores de massa tecidual e massa corporal dos animais ao final do experimento. A correlação entre as massas dos tecidos adiposo (figura 14A) e hepático (figura 14B) e a massa corporal apresentou coeficiente de correlação de 0,8645 e 0,7486, ambas classificadas como correlação positiva forte.

Figura 14 – Correlação das massas de tecido com a massa corporal dos animais no final do experimento.



Legenda – Correlação de Pearson entre massa de tecidos adiposo (A) e fígado (B) versus massa corporal, $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.6 Marcadores de estresse oxidativo

Após a realização do modelo experimental, os tecidos adiposo e hepático dos animais foram colhidos para investigação do efeito da silimarina sobre mediadores envolvidos no estresse oxidativo, uma vez que a obesidade gera um desbalanço redox nesses órgãos. Nesse sentido, foram determinadas as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (figura 15A e B), glutatona reduzida (GSH) (figura 15C e D) e a atividade da enzima

superóxido dismutase (SOD) (figura 15E e F). Os resultados estão apresentados tabela 7.

A produção de TBARS foi avaliada para medir a capacidade da silimarina em prevenir lipoperoxidação nos tecidos adiposo e hepático. Os resultados mostraram que as 3 doses de silimarina reduziram a concentração de TBARS em relação ao grupo obesidade. No tecido adiposo, os animais tratados com silimarina 100 mg/kg ($3,9 \pm 0,3$ μg de TBARS/mg de proteína), mantiveram níveis equiparados ao grupo controle. Os grupos tratados com silimarina nas doses de 10 mg/kg ($4,4 \pm 0,2$ μg de TBARS/mg de proteína) e 1 mg/kg ($5,2 \pm 0,4$ μg de TBARS/mg de proteína) apresentaram valores inferiores em comparação aos animais do grupo obesidade ($8,4 \pm 0,6$ μg de TBARS/mg de proteína). No tecido hepático, foi observado resultado semelhante, de forma que, para todas as doses de silimarina, não houve diferença com grupo controle.

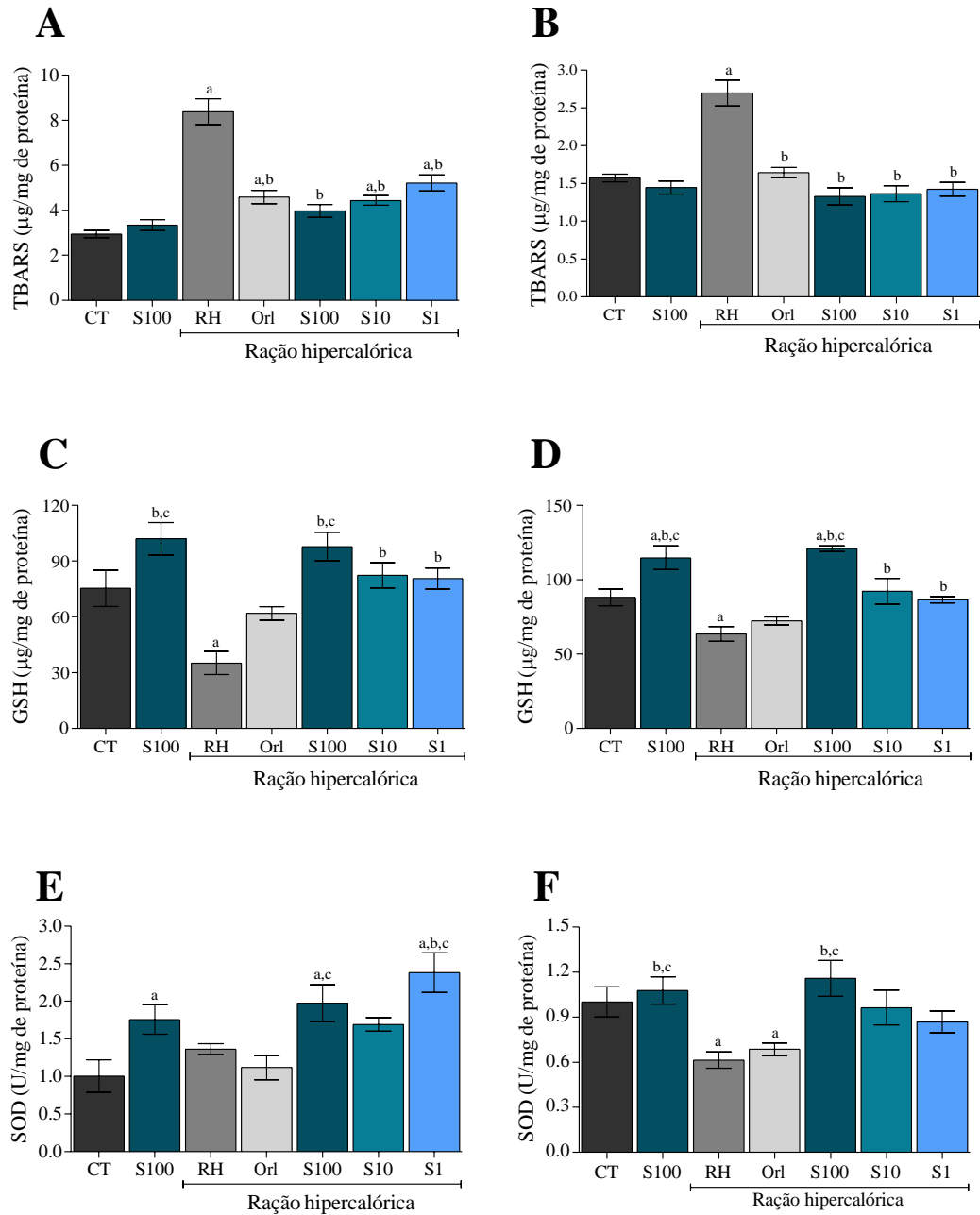
A glutatona reduzida representa uma das principais defesas antioxidantes nos tecidos, por meio da neutralização de espécies oxidantes teciduais. Dessa forma, a redução do conteúdo de GSH é um marcador importante de estresse oxidativo. No tecido adiposo, os animais tratados com silimarina 100 mg/kg ($97,9 \pm 7,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), 10 mg/kg ($82,4 \pm 6,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e 1 mg/kg ($80,6 \pm 5,63$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) apresentaram valores de GSH maiores quando comparados aos animais do grupo obesidade ($35,3 \pm 6,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e àqueles tratados com orlistate ($61,9 \pm 3,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

No tecido hepático, os grupos tratados com silimarina na dose 100 mg/kg, tendo recebido ração padrão ou ração hipercalórica, apresentaram os níveis de GSH elevados ($115,0 \pm 7,9$ e $121,0 \pm 1,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente) em comparação ao grupo obesidade ($63,6 \pm 4,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína). Além disso, os tratamentos com silimarina nas doses de 10 e 1 mg/kg foram capazes de manter os níveis de GSH equiparados ao grupo controle.

A indução de obesidade nos animais reduziu a atividade de superóxido dismutase (SOD) do grupo RH ($1,4 \pm 0,1$ U/mg de proteína) no tecido adiposo e ($0,6 \pm 0,1$ U/mg de proteína) no tecido hepático. O tratamento com silimarina foi capaz de prevenir essa redução, tendo sido observado esse efeito na dose de 100 e 1 mg/kg para o tecido adiposo e de 100 mg/kg no tecido hepático. Dos grupos que receberam a ração hipercalórica, os animais tratados com silimarina 100 mg/kg mantiveram os níveis de SOD similares aos observados no grupo controle no tecido hepático, e maiores quando comparados ao grupo tratado com o fármaco de referência. No tecido adiposo, a silimarina 100 e 1 mg/kg apresentaram níveis superiores ao

grupo controle, bem como ao grupo tratado com orlistate.

Figura 15 – Marcadores de estresse oxidativo no tecido adiposo (A, C e E) e tecido hepático (B, D e F) de camundongos submetidos ao modelo de obesidade.



Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (µg/mg de proteína); GSH = glutatona reduzida (µg/mg de proteína); SOD = superóxido dismutase (U/mg de proteína); CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett (^ap<0,05 vs. Grupo Controle; ^bp<0,05 vs. Grupo RH; ^cp<0,05 vs Grupo RH+Orl). Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Valores médios dos marcadores de estresse oxidativo em tecido adiposo e fígado de camundongos C57BL/6 em modelo de indução de obesidade.

Grupo	Tecido adiposo			Fígado		
	TBARS	GSH	SOD	TBARS	GSH	SOD
CT	2,9 ± 0,2	75,5 ± 9,8	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	88,2 ± 5,2	1,0 ± 0,1
S100	3,3 ± 0,2	102 ± 8,8 ^{b,c}	1,8 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,1	115 ± 7,9 ^{a,b,c}	1,1 ± 0,1 ^{b,c}
RH	8,4 ± 0,6 ^a	35,3 ± 6,1 ^a	1,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2 ^a	63,6 ± 4,8 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
RH+Orl	4,6 ± 0,3 ^{a,b}	61,9 ± 3,7	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1 ^b	72,3 ± 2,6	0,7 ± 0,04 ^a
RH+S100	3,9 ± 0,3 ^b	97,9 ± 7,7 ^{b,c}	2,0 ± 0,2 ^{a,c}	1,3 ± 0,1 ^b	121 ± 1,8 ^{a,b,c}	1,2 ± 0,1 ^{b,c}
RH+S10	4,4 ± 0,2 ^{a,b}	82,4 ± 6,9 ^b	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ^b	92,2 ± 8,6 ^b	1,0 ± 0,1
RH+S1	5,2 ± 0,4 ^{a,b}	80,6 ± 5,6 ^b	2,4 ± 0,3 ^{a,b,c}	1,4 ± 0,1 ^b	86,6 ± 2,1 ^b	0,9 ± 0,1

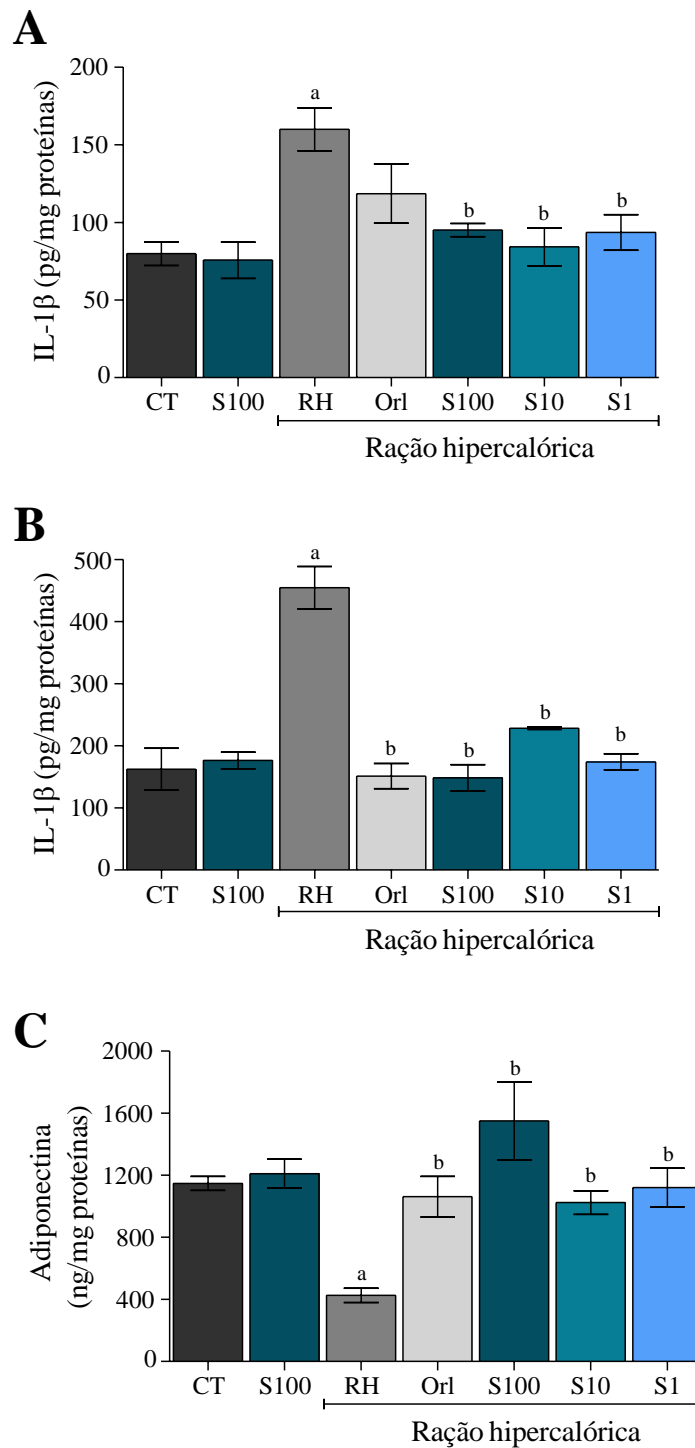
Legenda – os resultados estão expressos como média ± EPM. TBARS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (µg/mg de proteína); GSH = glutatona reduzida (µg/mg de proteína); SOD = superóxido dismutase (U/mg de proteína); CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett (^ap<0,05 vs. Grupo Controle; ^bp<0,05 vs. Grupo RH).

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.7 Mediadores inflamatórios

Nos tecidos adiposo e hepático, foram dosados os níveis do mediador pró-inflamatório IL-1 β , característico no processo inflamatório da obesidade, bem como da adiponectina, proteína anti-inflamatória produzida no tecido adiposo. No tecido hepático, o tratamento com silimarina nas 3 doses foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β , com valores entre 84 a 95 pg/mg de proteína, em comparação ao grupo obesidade (160,1 ± 13,8 pg/mg de proteína), mantendo-se similar ao grupo controle (79,9 ± 7,6 pg/mg de proteína). No tecido adiposo, os níveis de IL-1 β de todos os grupos tratados com silimarina não apresentaram diferença com o grupo controle (162,7 ± 33,8 pg/mg de proteína) e foram capazes de prevenir o aumento dos níveis dessa adipocitocina, em comparação ao grupo obesidade (454,9 ± 34,1 pg/mg de proteína). Além disso, o tratamento com silimarina foi capaz de manter os níveis de adiponectina equiparados ao grupo controle (1.147 ± 44,4 ng/mg de proteína), enquanto que os níveis dessa adipocitocina anti-inflamatória estavam reduzidos no grupo obesidade (426,9 ± 45,3 ng/mg de proteína), conforme apresentados na tabela 8 e figura 16.

Figura 16 – Níveis de mediadores inflamatórios em amostras de tecido hepático (A) e adiposo (B e C) de camundongos submetidos ao modelo de obesidade.



Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. grupo CT; ^bp<0,05 vs. grupo RH.
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Níveis teciduais de mediadores inflamatórios de camundongos submetidos a modelo de obesidade.

Grupo	Tecido adiposo		Tecido hepático
	IL-1 β (pg/mg de proteína)	Adiponectina (ng/mg de proteína)	IL-1 β (pg/mg de proteína)
CT	162,7 \pm 33,8	1.147 \pm 44,4	79,9 \pm 7,6
S100	176,4 \pm 13,4	1.211 \pm 92,8	75,7 \pm 11,7
RH	454,9 \pm 34,1 ^a	426,9 \pm 45,3 ^a	160,1 \pm 13,8 ^a
RH + Orl	151,6 \pm 20,1 ^b	1.062 \pm 131,6 ^b	118,6 \pm 19,1
RH + S100	148,5 \pm 21,2 ^b	1.551 \pm 251,8 ^b	95,6 \pm 4,2 ^b
RH+ S10	228,7 \pm 2,4 ^b	1.024 \pm 76,5 ^b	84,26 \pm 12,2 ^b
RH + S1	174,6 \pm 12,6 ^b	1.121 \pm 125,3 ^b	93,5 \pm 11,5 ^b

Legenda – os resultados estão expressos como média \pm EPM. A comparação dos dados entre os grupos experimentais foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. CT = controle; RH = ração hipercalórica; Orl = orlistate; S = silimarina (100, 10 e 1 mg/Kg). ^ap<0,05 vs. grupo CT; ^bp<0,05 vs. grupo RH.

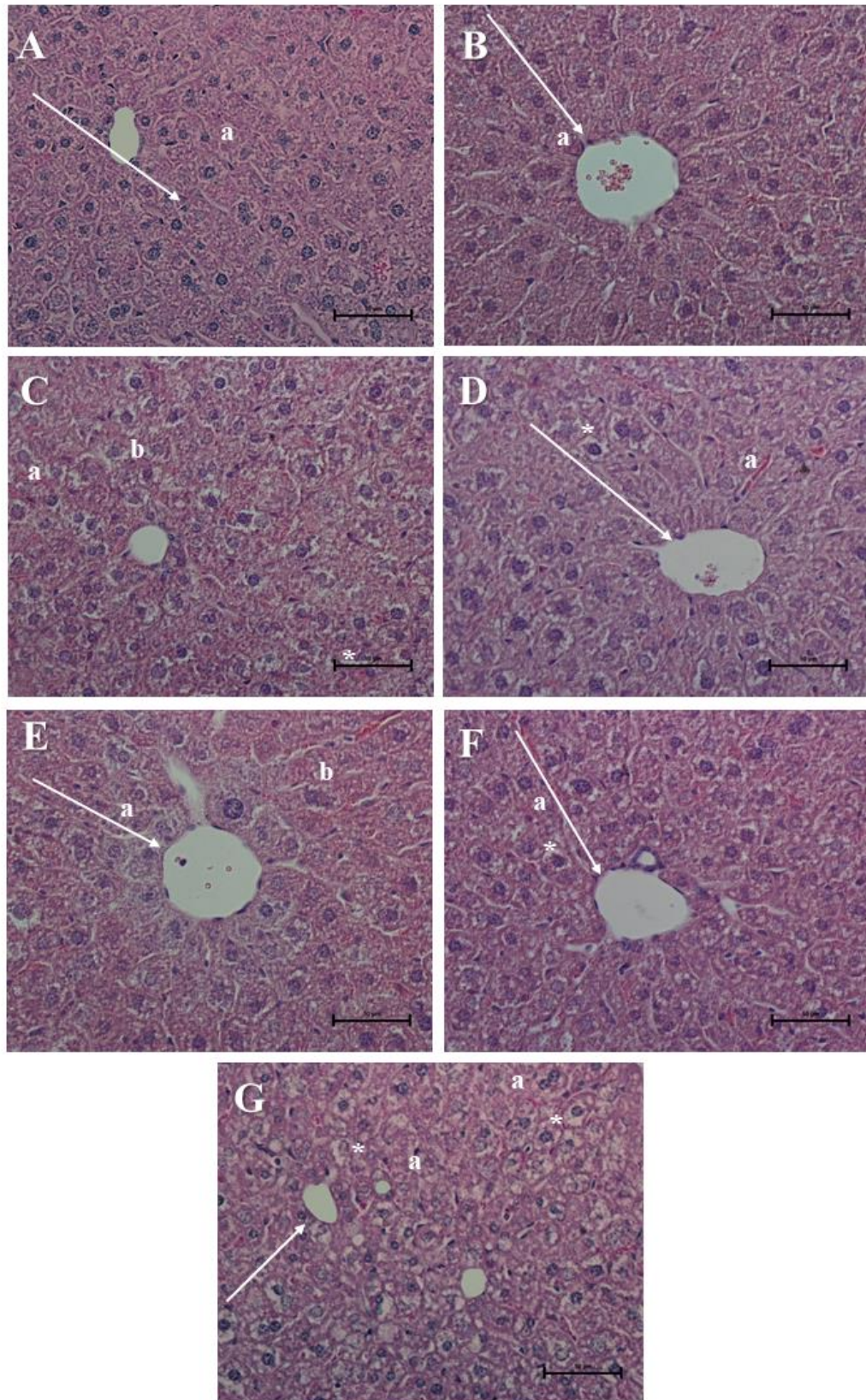
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.8 Análise histológica dos tecidos adiposo e hepático

A partir das análises histológicas, o tecido hepático dos animais do grupo RH apresentaram acúmulo de lipídeo perinuclear, distorção da razão núcleo/citoplasma dos hepatócitos e degeneração nuclear, relacionados com esteatose hepática (figura 17). Ademais, foi notória a ocorrência de ductos hepáticos, congestão vascular e presença de células inflamatórias. Alterações similares foram observadas no grupo RH + Orl. O tratamento com silimarina preveniu o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, reduziu ductos hepáticos e congestão vascular e a presença de células inflamatórias, principalmente na dose de 100 mg/kg (figura 17E).

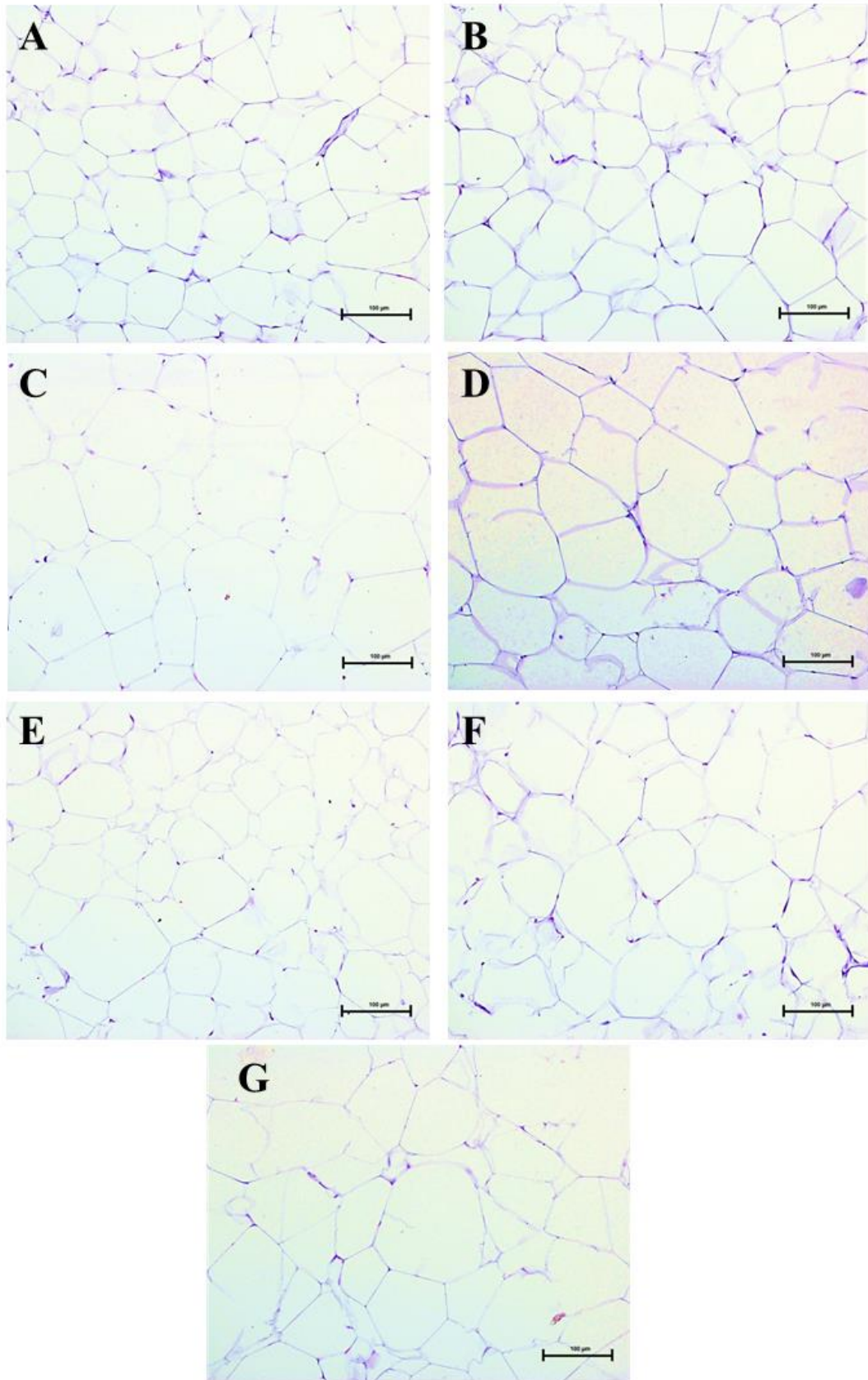
No tecido adiposo dos animais do grupo RH e RH + Orl, era predominante a presença de adipócitos cilíndricos e hipertrofiados. Os grupos tratados com silimarina apresentaram células icosaédricas e menos hipertrofiadas, similares ao grupo CT (figura 17).

Figura 17 – Análise histológica de tecido hepático de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Legenda – A – grupo controle (CT); B – grupo S100 (silimarina 100 mg/kg); C – grupo RH; D – grupo RH + Orli; E – grupo RH + S100; F – grupo RH + S10 e G – RH + S1. Setas – Obstrução de ductos hepáticos; * - acúmulo de lipídeos perinuclear; a – obstrução sanguínea de ductos hepáticos; b – degeneração nuclear.

Figura 18 – Análise histológica de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 submetidos a modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.



Legenda – A – grupo controle (CT); B – grupo S100 (silimarina 100 mg/kg); C – grupo RH; D – grupo RH + Orl; E – grupo RH + S100; F – grupo RH + S10 e G – RH + S1.

5.2 Docking molecular

Foram investigadas as interações entre os compostos constituintes da silimarina com a enzima lipase pancreática, sendo os resultados comparados com o fármaco orlistate e o inibidor co-cristalizado MUP. As moléculas estudadas, exceto isosilibina B e silidianina, interagiram no mesmo sítio (Ser152, Asp176 e His263) ou região próxima do inibidor co-cristalizado (Figura 19).

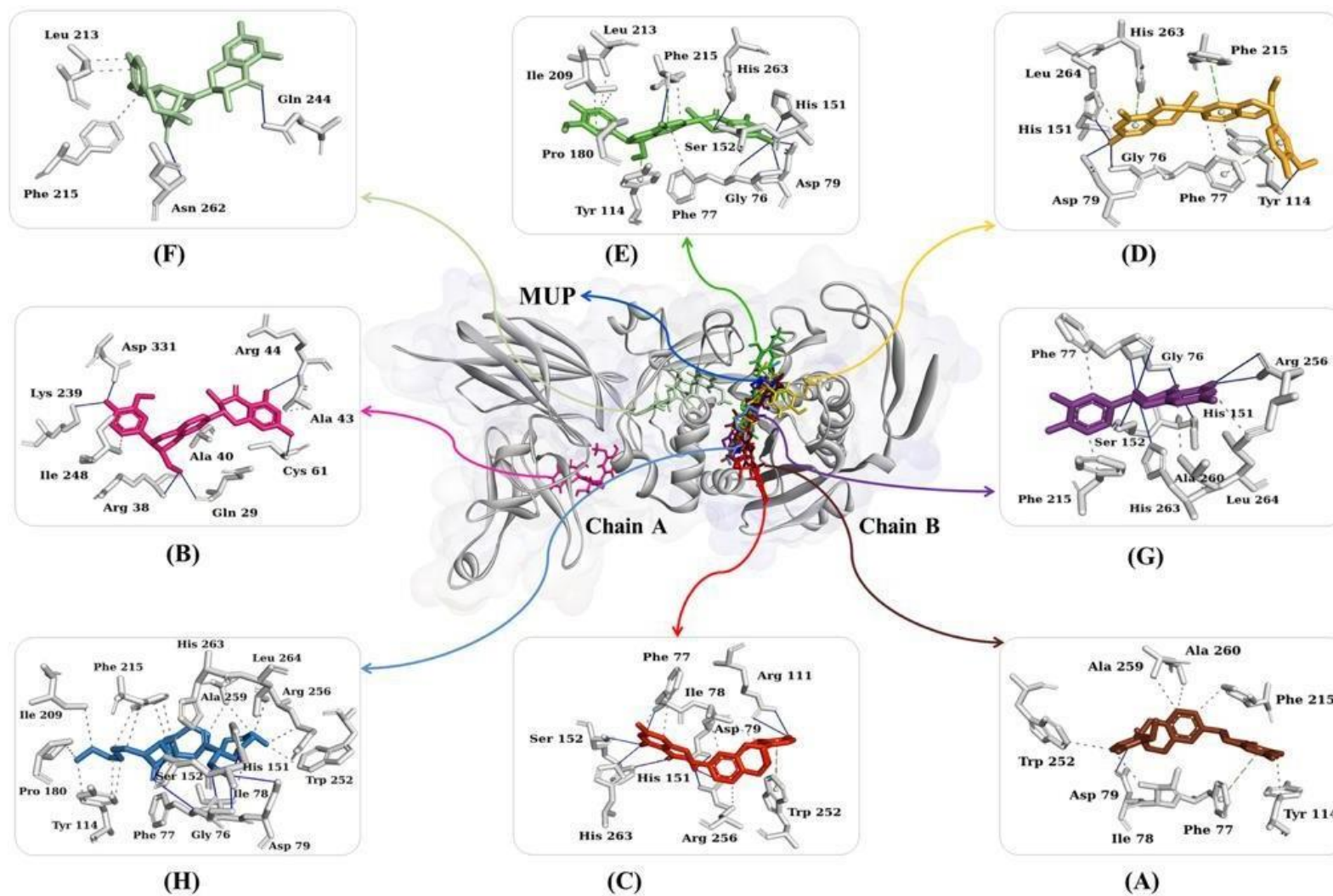
Através das *best pose* geradas foram observados valores de RMSD na ordem de 0,566 a 1,985 Å e energia de afinidade (ΔG) na ordem de -10,5 a -8,6 kcal.mol⁻¹, melhores que os valores encontrados para o fármaco de referência orlistate (-7,4 kcal.mol⁻¹) e o inibidor MUP (-5,0 kcal.mol⁻¹) (Tabela 9).

Tabela 9 – Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados entre os ligantes e a enzima lipase pancreática obtidos por docking molecular.

Ligantes/Enzima	Lipase pancreática	
	Energia de afinidade (kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
Isosilibina A	-8,8	1,569
Isosilibina B	-8,6	1,955
Silibina A	-9,3	1,626
Silibina B	-9,2	1,393
Silicristina	-10,5	1,985
Silidianina	-9,5	0,566
Taxifolina	-9,2	0,612
Orlistate	-7,4	1,504
MPU*	-5,0	1,326

Legenda – *MPU: ácido metoxiundecilfosfínico; RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Complexo de interação entre a lipase pancreática com os compostos presentes na silimarina.



Legenda – isosilibina A (A), isosilibina B (B), silibina A (C), silibina B (D), silicristina (E), silidianina (F), taxifolina (G), orlistate (H) e ácido metoxiundecilfosfônico - MUP.
Fonte: elaborado pelo autor.

Silibina A, silicristina e taxifolina interagiram com His263 por meio de ligação de hidrogênio, com valores de distância de 2,28; 3,19 e 3,09 Å, respectivamente. Enquanto silibina B e orlistate apresentaram interações do tipo π -stacking (5,23 Å) e *salt bridge* (4,92 Å), respectivamente. Os componentes silibina A, silicristina, taxifolina e o fármaco orlistate interagiram com o resíduo Ser152 por meio de ligação de hidrogênio, com distâncias que variaram de 2,54 a 2,68 Å.

Além disso, os componentes da silimarina interagiram com resíduos de importância para a atividade enzimática, como os resíduos Phe77 (isosilibina A, silibina A, silibina B, silicristina e taxifolina), Phe215 (isosilibina A, silibina B, silicristina e silidianina) e Tyr114 (isosilibina A, silibina B e silicristina), Trp252 (isosilibina A e silibina A) (tabela 10).

Tabela 10 – Interações dos principais componentes da silimarina com a enzima lipase.

Resíduos de Aminoácidos	Distâncias intermoleculares (Å) e tipos de interação							
	Isb A	Isb B	Slb A	Slb B	Slc	Sld	Txf	Orl
Ala259	3,74	-	-	-	-	-	-	3,53 3,61
Ala260	3,62	-	-	-	-	-	3,67	-
Ala40	-	3,42	-	-	-	-	-	-
Ala43	-	3,60	-	-	-	-	-	-
Arg 38	-	2,34	-	-	-	-	-	-
Arg44	-	3,29	-	-	-	-	-	-
Arg111	-	-	3,49 3,47	-	-	-	-	-
			3,63	-	-	-	3,34	-
Arg256	-	-	2,62 2,83	-	-	-	2,42	3,58
Asn262	-	-	-	-	-	2,17	-	-
Asp79	3,49	-	2,29	2,65 2,74	2,70	-	-	3,28
Asp331	-	2,18	-	-	-	-	-	-
Cys61	-	2,11	-	-	-	-	-	-
Gln 29	-	2,21	-	-	-	-	-	-
Gln244	-	-	-	-	-	2,55	-	-
Gly76	-	-	-	2,43	2,37	-	3,44	2,61
His151	-	-	3,56	2,21	2,21	-	3,13	2,50
His263	-	-	2,28	5,23	3,19	-	3,09	4,92
Ile78	3,68	-	3,71 3,39	-	-	-	-	3,81
Ile209	-	-	-	-	3,83 3,89	-	-	3,92
Ile248	-	3,31 3,99	-	-	-	-	-	-
Leu213	-	-	-	-	3,54	3,86 3,68	-	-
Leu264	-	-	-	3,64	-	-	3,65	3,77
Lys239	-	2,23	-	-	-	-	-	-
Phe77	5,01	-	3,74 3,86 3,32	3,68 4,88	3,97 3,46	-	3,20 2,30 3,10	3,51 2,65 3,13
					3,58	-	-	3,51
Phe215	3,62	-	-	4,45	2,32 4,27	3,58	3,41	3,70 3,89 3,95
Pro180	-	-	-	-	3,82	-	-	3,77
Ser152	-	-	2,68 2,55	-	2,93	-	2,57	2,54
Trp252	3,75	-	4,87	-	-	-	-	3,59
Tyr114	3,73	-	-	3,49 3,80 2,28	4,01	-	-	3,69 3,74 3,94

Legenda – Tipos de interações: **Ligação de hidrogênio**, **Interações hidrofóbicas**, **π -Stacking**, **Salt Bridge**.
 Compostos: Isosilibina A (Isb A), Isosilibina B (Isb B), Silibina A (Slb A), Silibina B (Slb B), Silicristina (Slc), Silidianina (Sld), Taxifolina (Txf) e Orlistate (Orl). Resíduos de aminoácido: Alanina (Ala); Arginina (Arg); Asparagina (Asn); Aspartato (Asp); Cisteína (Cys); Fenilalanina (Phe); Glicina (Gly); Glutamina (Gln); Histidina (His); Isoleucina (Ile); Leucina (Leu); Lisina (Lys); Prolina (Pro); Serina (Ser); Tirosina (Tyr); Triptofano (Trp).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença metabólica caracterizada pelo desbalanço energético, em que o excesso de calorias absorvidas leva ao acúmulo de gordura abdominal, usualmente relacionada a outras comorbidades, além de inflamação e estresse oxidativo. É resultado de fatores hereditários, fisiológicos e ambientais, em combinação com aspectos sociais e econômicos, como dieta e sedentarismo (MAYORAL et al., 2020; RUZE et al., 2023). Estatísticas recentes mostram que aproximadamente 30% da população mundial (mais de 2 bilhões de pessoas) é considerada com sobrepeso ou obesa (CABALLERO, 2019). Em adição, a atual farmacoterapia antiobesidade é limitada e os efeitos colaterais e adversos dificultam a adesão do paciente ao tratamento (LEUNG et al., 2003).

Flavonoides têm sido apontados como compostos promissores devido as propriedades antioxidante e anti-inflamatória, as quais são fatores-chave no contexto da obesidade e das desordens relacionadas a essa doença. Nesse contexto, a silimarina, extrato obtido a partir da planta *Silibum marianum*, apresenta atividade antioxidante e hepatoprotetora (SURAI, 2015), cardioprotetora (SINGH et al., 2023), hipolipemiante (EBRAHIMPOUR-KOUJAN et al., 2015), hipoglicemiante (KARIMI et al., 2022) e antiaterogênica (ZHANG et al., 2022), sendo um candidato promissor no desenvolvimento de compostos antiobesidade.

Recentemente, componentes bioativos extraídos das sementes de *S. marianum* demonstraram potencial na prevenção de complicações associadas à obesidade, por meio da atividade *scavenger* de radicais livres e inibição da oxidação de lipoproteína de baixa densidade (ELHASSANEEN et al., 2023). As substâncias presentes no extrato (silimarina, compostos fenólicos, flavonoides, α -tocoferol, taninos, dentre outros) foram capazes de reduzir o ganho de massa corporal em ratos obesos, além de reduzir os níveis de marcadores de função hepática como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bem como biomarcadores séricos do perfil lipídico (SAYIN et al., 2016).

Além disso, um estudo mostrou o efeito antiobesidade da silimarina em ratos com indução por dieta hipercalórica, demonstrado pela redução de massa corporal e melhora dos parâmetros séricos lipídicos (SAYIN et al., 2016). Dessa forma, o presente trabalho se propôs a estudar o papel antioxidante da silimarina em animais obesos, bem como as interações teóricas dos seus componentes com a lipase pancreática. Foram mensurados os parâmetros de ganho de massa corporal, ingestão de água e ração, massa dos tecidos hepático e adiposo, bem como

marcadores de estresse oxidativo.

Para a indução do modelo de obesidade, foram utilizados camundongos machos C57BL/6, linhagem isogênica que é mais comumente utilizada no estudo de doenças metabólicas e que apresenta maior suscetibilidade para o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta e resistência à insulina (SEEGER; MURPHY, 2016). Camundongos C57BL/6 submetidos a dieta hipercalórica tendem a aumentar a massa corporal e reduzir a β -oxidação hepática, fatores correlacionados com o aumento da obesidade nos animais (COOPER et al., 2018).

Os camundongos receberam ração hipercalórica (RH), uma preparação palatável composta por ração padrão, amendoim, chocolate ao leite e biscoito doce. A composição tem como objetivo simular dieta de cafeteria com alto teor calórico e foi capaz de induzir obesidade em ratos (ESTADELLA et al., 2004). Para validar o protocolo, os camundongos foram tratados com orlistate, um inibidor de lipase gástrica e pancreática capaz de reduzir a absorção de lipídios provenientes da ração hipercalórica utilizada no modelo (HECK; YANOVSKI; CALIS, 2000a).

Estudos comprovaram que o alto teor de gordura nas rações utilizadas em modelos experimentais de indução de obesidade são ferramentas úteis para a indução de adipogênese e o desenvolvimento de síndrome metabólica, o que possibilita a avaliação do efeito antiobesidade de substâncias promissoras (BRAHMANAIDU et al., 2014; SEO et al., 2018).

Previamente, trabalhos que realizaram o modelo *in vivo* de obesidade utilizaram diferentes percentuais de lipídeos no preparo de RH. O estudo de Sayin *et al.* (2016), realizado com ratos, utilizou RH com 54% de calorias provenientes de gorduras, com teor energético de 4,9 kcal/g. Em camundongos C57BL/6, o teor de gordura presente nas RH utilizadas variou entre 34% e 60% (HAMADA et al., 2022; SHI et al., 2019; ZHOU et al., 2023). Esses trabalhos obtiveram resultados semelhantes quanto ao ganho de massa corporal aos encontrados no presente trabalho, em que a RH era composta por 20% de gorduras, com teor energético 25% maior em comparação a ração padrão.

Os modelos de indução de obesidade em animais utilizam rações com altos teores de gordura e/ou açúcar e tem validade translacional, uma vez que é capaz de induzir os mesmos distúrbios metabólicos que ocorrem em humanos (KLEINERT et al., 2018; SMALL et al., 2018). Em contrapartida, as dietas hipercalóricas frequentemente utilizam níveis mais elevados

de gordura do que está presente na alimentação humana, em torno de 30%, e não simulam adequadamente o modo de consumo. No presente estudo, a quantidade de gordura presente na RH (20%) é mais fidedigna ao consumo humano de dieta de cafeteria, levando à obtenção de dados mais translacionais (LALANZA; SNOEREN, 2021).

Sendo assim, a massa corporal dos animais foi monitorada durante os 55 dias do modelo experimental. Os animais que receberam ração padrão (grupo controle) obtiveram um ganho de massa corporal relativa de 21,3%, ao passo que o grupo que recebeu RH sem tratamento obteve um aumento de quase 70%. Estudos de indução de obesidade em camundongos C57BL/6 mostraram resultados semelhantes (HAMADA et al., 2022; SUN et al., 2020). Observou-se que o tratamento com silimarina 100 mg/kg (RH + S100) e orlistate preveniram o ganho excessivo de massa corporal em aproximadamente 40%, bem como grupos RH + S10 e RH +S1 prveniram o ganho de massa corporal em 29 e 19%, respctivamente.

Estudos que utilizaram outros flavonoides mostraram o potencial antiobesidade dessa classe. A miricetina reduziu o ganho de massa corporal em 19,8%, em doses orais de 150 mg/kg diárias por 10 semanas (SU et al., 2016). Flavonoides provenientes de frutas cítricas, naringerina e nobiletina, reduziram em 13% o ganho de massa corporal em tratamento por 12 semanas (BURKE et al., 2018). Camundongos que receberam antocianinas obtidas a partir de mirtilo e amora durante 12 semanas reduziram o ganho de massa em 7,3 e 9,8%, respectivamente (WU et al., 2013). Sendo assim, em comparação com esses trabalhos, a silimarina apresentou efeito sobre o ganho de massa corporal em menor tempo de tratamento.

A atividade antiobesidade da silimarina já está descrita e parece estar associada à presença de substâncias no extrato com efeito antioxidante e sobre o metabolismo lipídico. O uso concomitante de silimarina com RH diminuiu o ganho de massa corporal e está de acordo com achados em outros trabalhos, indicando que o uso suplementar de silimarina na dieta pode reduzir as chances de desenvolvimento de obesidade e seus riscos em populações com dieta rica em lipídeos (SAYIN et al., 2016).

A melhora no perfil lipídico por esses compostos, bem como o efeito hepatoprotetor, decorrem do aumento intracelular de compostos antioxidantes (GILLESSEN; SCHMIDT, 2020). A silimarina melhora a atividade metabólica através de modulação gênica relacionada ao metabolismo lipídico e do controle de estresse oxidativo, demonstrado pela redução do acúmulo de triglicédeos nas células dos tecidos adiposo e hepático e pela melhora

dos níveis séricos de triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (NI; WANG, 2016).

Em relação ao consumo de ração e de água, observou-se que os animais que receberam RH apresentaram apenas redução do consumo de ração. Assim, o ganho de massa corporal observado no decorrer dos 55 dias de experimento pode ser atribuído a alteração no metabolismo energético das gorduras provenientes da dieta e não ao aumento do consumo de ração. Dessa forma, o modelo permite o estudo de moléculas com potencial de melhorar o metabolismo lipídico (GUPTA; OSADCHIY; MAYER, 2020) e impedir o desenvolvimento e agravamento da obesidade por interferência na utilização e metabolismo de nutrientes.

Isso é um diferencial quando comparado aos principais fármacos disponíveis no mercado, que tem como objetivo principal a inibição de apetite, como anfepramona e sibutramina. Estudos clínicos mostraram que o tratamento diário de sibutramina por seis meses reduziu em até 10% o ganho de massa corporal, sendo ainda necessária a manutenção de dieta regulada e atividade física. Entretanto, os efeitos adversos mais comuns (cefaleia, boca seca, anorexia, insônia e constipação), o risco à pacientes hipertensos e o ganho de peso decorrente da interrupção do tratamento podem comprometer a adesão terapêutica (NISOLI; CARRUBA, 2000).

Estudos com modelo de indução de obesidade em animais, que utilizaram ração hipercalórica, mostraram que os animais que receberam ração rica em conteúdo lipídico passam a consumir quantidades menores de ração, provavelmente devido a influência da gordura sobre a palatabilidade (SAYIN et al., 2016; ZHOU et al., 2023). Dessa forma, é comum a ocorrência de hipofagia nesses modelos que simulam dieta de cafeteria, sendo consequência da menor variedade de propriedades sensoriais na ração modificada (LA FLEUR et al., 2014).

Em adição, as massas dos tecidos adiposo e hepático foram mensuradas. Todas as doses de silimarina reduziram a massa dos tecidos, em comparação ao grupo obesidade. É sabido que uma dieta hipercalórica pode aumentar a síntese e a entrega de ácidos graxos livres no fígado. Além disso, há uma redução na β -oxidação dos ácidos graxos livres, o que contribui para a deposição de gordura no tecido hepático e desenvolvimento de esteatose hepática (SAYIN et al., 2016). Adicionalmente, o consumo de dietas hipercalóricas favorece o processo de deposição de triglicerídeos (TG) no tecido adiposo, que recebe estímulo para formação de novos adipócitos (adipogênese), além de ocorrer aumento do tamanho celular (hipertrofia) para

comportar maior quantidade de TG (KA et al., 2009).

A partir dos resultados de ganho de massa corporal e massa dos tecidos, foi possível avaliar a relação entre esses parâmetros através da correlação de Pearson. Observou-se que para ambos os tecidos, há uma correlação positiva forte. Isso mostra que o ganho de massa corporal nos animais está relacionado ao aumento do tecido adiposo e do fígado, o que corrobora com o quadro clínico de obesidade e o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (EHNA) (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019; QURESHI; ABRAMS, 2007).

Trabalhos anteriores mostraram que indivíduos obesos apresentam maior chance de desenvolvimento de EHNA, com prevalência dependente de fatores étnicos, idade, predisposição genética e comorbidades. Em casos de pacientes com obesidade mórbida, essa prevalência chega a 90% (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019). Estudos que realizaram modelo de obesidade *in vivo* com camundongos C57BL/6 mostraram um aumento na massa do fígado nos animais obesos, semelhante aos achados do presente estudo (HEIJDEN et al., 2015; ZHANG et al., 2022b). Estudo clínico mostrou que o uso diário de silimarina (140mg) apresentou eficácia na redução da esteatose hepática e poucos efeitos colaterais (HASHEM, 2023).

Nesse contexto, chalconas, moléculas precursoras de flavonoides, isoladas de *Glycyrrhiza uralensis* tem mostrado efeitos protetores capazes de reduzir a prevalência de esteatose em animais obesos. Flavonoides obtidos a partir de *Pueraria lobata* reduziram a massa corporal e massa de fígado de animais obesos, diminuindo a deposição de lipídeos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, mediada pelo estresse oxidativo e morte celular de adipócitos (LEE et al., 2020; LIOU et al., 2019; SUN et al., 2023).

Os grupos tratados com silimarina reduziram o Ct e Tg plasmáticos, em comparação ao grupo RH. ALT e AST plasmáticos, biomarcadores de dano hepático, apresentaram níveis reduzidos em grupos tratados com silimarina. A silimarina tem mostrado a capacidade de reduzir o níveis de lipoproteínas em ratos diabéticos (TUORKEY; EL-DESOUKI; KAMEL, 2015). Além disso, uma metanálise envolvendo 16 estudos clínicos publicado em 2020 mostrou que a silimarina foi capaz de reduzir os níveis de Tg, Ct e lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como aumentar os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em pacientes com disfunção no metabolismo glicídico/lipídico (XIAO et al., 2020).

Adicionalmente, dano hepático induzido por EHNA está relacionado a liberação

das enzimas ALT e AST em plasma de pacientes com essa condição. Então, os animais do grupo RH apresentaram altos níveis dessas enzimas, enquanto o tratamento com a silimarina os reduziu. Portanto, pode-se inferir que esse produto natural pode reduzir o dano hepatocelular causado pela deposição de lipídeos no tecido hepático (NIE et al., 2023).

Desse modo, sabendo-se do efeito antioxidante da silimarina, foram mensurados marcadores de estresse oxidativo em homogenatos dos tecidos adiposo e hepático dos animais. O tratamento com silimarina preveniu o aumento de TBARS, o consumo de GSH and aumentou a atividade de SOD nos dois tecidos, quando comparados ao grupo obesidade. Em contrapartida, o tratamento com orlistate foi capaz de reduzir somente o níveis de TBARS.

Estudos correlacionaram o efeito da silimarina em doenças metabólicas com o seu potencial antioxidante e anti-inflamatório através da redução nos níveis de proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa e de peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade das enzimas glutatona peroxidase e SOD (ALTAEI, 2012; EBRAHIMPOUR-KOUJAN et al., 2015). Ademais, a prevenção da formação de EROs (radicais hidroxil, ânions peroxil e ânion hipocloroso), através do efeito *scavenger* da silimarina, também contribui para o retardo do estabelecimento e progressão da obesidade e da EHNA (SURAI, 2015).

A propriedade antioxidante de compostos polifenólicos é atribuída, sobretudo, à capacidade destes em neutralizar EROs. Essa propriedade varia conforme a disposição estrutural do grupo funcional ligado ao anel (ARZOLA-RODRÍGUEZ et al., 2022), bem como o número e a posição da hidroxila no anel B do catecol e sua posição no anel C do pirano (D'AMELIA et al., 2018). Flavonoides, principalmente aqueles dihidroxilados, são apontados como *scavengers* mais efetivos, uma vez que o maior número de grupos hidroxila aumenta a capacidade da molécula de doar elétrons e hidrogênio, bem como formar radicais adutos (DIAS et al., 2020; REINA; MARTÍNEZ, 2016).

Outros mecanismos, além da eliminação direta de EROs, têm sido descritos, como a inibição da formação de EROs por quelação com organelos (como a queratina com propriedades estabilizadoras de ferro) ou pela inibição de enzimas que participam na geração de radicais livres (monooxigenase microssomal, NADPH oxidase, xantina oxidase), bem como através da regulação positiva de enzimas antioxidantes, como a SOD (KALEEM; AHMAD, 2018; KUMAR; PANDEY, 2013; RANA; GULLIYA, 2019).

A principal ação antioxidante de compostos presentes na silimarina consiste na

manutenção do balanço redox celular, através da ativação de fatores antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, principalmente pela ativação do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), um regulador de genes que expressam proteínas de proteção contra xenobióticos e estresse oxidativo (MILIĆ et al., 2013). Já foi demonstrada a capacidade da silimarina de ativar genes responsáveis pela síntese de moléculas protetoras, como proteínas de choque térmico, tioredoxina e sirtuínas (SURAI, 2015).

Nas células do fígado, compostos isolados da silimarina inibiram transportadores de íons orgânicos e a expressão de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e suprimiram a via de ativação do fator nuclear κ de cadeia leve ativador de células B (NF- κ B), bem como reduziram a captação celular de xenobióticos. Outrossim, esses compostos parecem estabilizar a permeabilidade da membrana celular através da inibição da peroxidação lipídica, por meio da manutenção dos níveis de GSH (GILLESSEN; SCHMIDT, 2020; MILIĆ et al., 2013). A associação entre estresse oxidativo, peroxidação lipídica e eventos inflamatórios estão amplamente descritos (KUMAR; PANDEY, 2013; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Nesse sentido, a inflamação associa-se às complicações relacionadas à obesidade e ocorre em resposta a diversas causas, tais como injúria física tecidual ou trauma, exposição química e infecções microbianas. Usualmente, o processo inflamatório é rápido e autorregulado, mas em alguns casos, pode insistir por longos períodos e contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas ou degenerativas como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Assim, mediadores inflamatórios foram mensurados para avaliar o efeito anti-inflamatório da silimarina. A ração hipercalórica induziu o aumento de IL-1 β em ambos os tecidos, bem como reduziu os níveis de adiponectina no tecido adiposo. A silimarina reduziu esse efeito em todas as doses testadas. Os adipócitos liberam várias citocinas que aumentam a produção e circulação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , interleucina 6 e IL-1 β , os quais apresentam níveis elevados em situação de hipertrofia e hiperplasia de adipócitos e hipóxia (VARÌ et al., 2021). No tecido hepático, IL-1 β estimula a lipogênese e esteatose hepática, mediando o acúmulo de Tg via lipogênese de novo na obesidade (NEGRIN et al., 2014).

Nesse contexto, flavonoides atuam como *scavengers* de EROs, reduzindo sua

acumulação nos tecidos e inibindo a atividade de enzimas regulatórias (proteínas quinases e fosfodiesterases) e de fatores de transcrição relacionados ao controle de mediadores inflamatórios, bem como por imunomodulação (KUMAR; PANDEY, 2013; MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019).

Ressalta-se que fatores ambientais e genéticos são relevantes no processo inflamatório. Muitos estudos mostram como um estilo de vida com dieta saudável, rica em frutas e vegetais, com alimentos não-processados e com baixo teor de açúcar previnem doenças inflamatórias (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Alguns grupos de flavonoides, como flavonóis (quercetina), flavanonas (hesperetina), flavanóis (catequina), isoflavonas (genisten) e antocianinas (cianidina) tem demonstrado efeito anti-inflamatório em experimentos *in vitro* e *in vivo*, além de estudo clínicos (GINWALA et al., 2019; JUCÁ et al., 2020).

Na obesidade, baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como adiponectina, estão associadas ao desenvolvimento de câncer (PRADO et al., 2009). Adicionalmente, adiponectina modula o metabolismo de ácidos graxos resultando em efeitos positivos na homeostase, bem como inibe citocinas pró-inflamatórias e estimula liberação de interleucina-10 (IL-10) protegendo células de morte celular programada induzida por citocinas pró-inflamatórias (ACHARI; JAIN, 2017; PARIDA; SIDDHARTH; SHARMA, 2019).

Dentro das muitas estratégias de desenvolvimento de moléculas antiobesidade, além da modulação do estresse oxidativo e da produção de mediadores inflamatórios, outros alvos envolvidos com a absorção, distribuição e eliminação de lipídeos têm sido investigados, como a enzima lipase lipoproteica pancreática (LP), enzima chave na quebra e absorção de triglicerídeos provenientes da dieta. Dessa forma, estudos de docking molecular foram realizados com o intuito de avaliar possíveis interações entre os compostos presentes na silimarina e esse alvo.

As simulações performadas mostraram que os compostos presentes na silimarina interagem com a enzima LP com valores de energia de afinidade melhores quando comparados ao orlistate e o inibidor MUP. Dentre os compostos presentes no extrato, cinco (isosilibina A, silibina A, silibina B, silicristina e taxifolina) acoplaram-se próximos ao sítio catalítico, formado pela tríade Ser152, Asp176 e His263. As interações com His 263 limitam a velocidade da reação de hidrólise (NOOR et al., 2019). Adicionalmente, o resíduo Phe215, localizado próximo a Ser152, constitui uma região importante para interações com a porção hidrofílica do

substrato, onde ocorre a reação de hidrólise dos ácidos graxos ligados ao glicerol nos triglicerídeos (YAKAIAH; DAKSHINAMOORTHI; TY, 2021). Isosilibina A, silibina B, silicristina e silidianina interagiram diretamente com Phe215 através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e π -stacking.

Ainda sobre a interação entre os componentes da silimarina com resíduos de LP de importância, isosilibina A, silibina A, silibina B, silicristina e taxifolina apresentaram interação com Phe77 por meio de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e π -stacking. Esse resíduo é importante para a dissociação dos ácidos graxos da molécula de glicerol e para a estabilização do ligante na enzima. As maioria das interações do tipo ligação de hidrogênio apresentaram valores de distância menores que 3,1 Å, caracterizando como interações fortes. Em adição, os resíduos Phe77, Tyr114 e Trp252 atuam na manutenção da conformação da proteína. Phe215 está localizado próximo ao resíduo de Ser152 e apresenta perfil hidrofílico, no qual a porção polar dos lipídeos se ligam. Isosilibina A e silibina A interagiram com resíduo Trp 252, o qual encobre o sítio catalítico da enzima e regula a interação de ligantes com Phe 77, Leu 153 e Tyr 114 (IMBERTY et al., 1991; NOOR et al., 2019).

Dessa forma, os principais compostos presentes no extrato de silimarina demonstram potencial para modular a ação da enzima LP por diferentes vias. No sítio catalítico, isosilibina A, silibina B e silicristina interagiram com resíduos que interferem na conformação da enzima, além de poder competir com os triglicerídeos no sítio catalítico. Ademais, esses flavonoides se ligaram a resíduos que limitam a velocidade da hidrólise, o que pode reduzir a absorção de ácidos graxos livres e otimizar sua distribuição nos tecidos. A enzima LP apresenta homologia com a enzima lipase hepática que atua no metabolismo de triglicerídeos e fosfolipídeos, presentes em lipoproteínas. Logo, a possível inibição de lipase hepática pode contribuir para o efeito biológico de proteção hepática e antiobesidade da silimarina (LIM; STEINER; CRIDGE, 2022).

Em comparação, o orlistate, fármaco antiobesidade e inibidor de LP, acopla na enzima através de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e *salt bridge* nos resíduos His263 e Ser152, situados no sítio catalítico, bem como com Phe77, Phe215, Tyr114, Trp252, resíduos importantes para o funcionamento da enzima (VEERAMACHANENI et al., 2015).

Estudos prévios mostraram o potencial de compostos polifenólicos de interagir com o sítio catalítico da enzima lipase (Ser153, Asp176 e His263) (MARTINEZ-GONZALEZ et

al., 2017). Além disso, outros compostos aromáticos, como derivados benzimidazólicos e substâncias anti-histamínicas, vem sendo testados e apresentaram potencial de acoplar em região próxima do sítio catalítico (KHEDIDJA; MADJDA; ABDERRAHMANE, 2018; MENTEŞE et al., 2018).

Compostos flavonoides (chalconas, apigenina, narigenina, quercetina, taxifolina, genisteína e catequina) apresentaram interações com os resíduos de serina, asparagina e histidina presentes no sítio catalítico de isoformas de LP, assim como inibição da atividade da enzima *in silico* e *in vitro*. Foi demonstrado que flavonoides acoplam na LP por meio de interações que incluem ligação de hidrogênio, van der Waals e π -stacked (HOU et al., 2020; LI et al., 2023).

A capacidade de isosilibina A, silibina A, silibina B e silicristina de interagirem no sítio catalítico e com resíduos importantes para a atividade da enzima, bem como as características estruturais dessas moléculas demonstram o seu potencial para inibir a lipase pancreática e suas isoformas, mostrando-se promissores no tratamento antiobesidade.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a silimarina mostrou ser capaz de reduzir a massa corporal de camundongos em modelo de indução de obesidade, através da melhora no metabolismo lipídico, resultando em menor deposição de triglicerídeos nos tecidos hepático e adiposo, reduzindo adipogênese e hipertrofia de adipócitos. Ademais, compostos presentes no extrato de silimarina podem interagir com a enzima LP em regiões importantes para sua ação na quebra e absorção de lipídeos, o que contribui com a menor deposição de triglicerídeos nos tecidos. Esse efeito está associado ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, destacando o potencial promissor no tratamento da obesidade e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS

- ACHARI, A.; JAIN, S. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–17, 21 jun. 2017.
- ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021.
- AGUILAR DIAZ DE LEON, J.; BORGES, C. R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 159, 12 maio 2020.
- ALMEIDA, L. M. et al. Estratégias e desafios da gestão da atenção primária à saúde no controle e prevenção da obesidade. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v. 08, n. 01, p. 114–139, jan. 2017.
- ALTAEI, T. The treatment of melasma by silymarin cream. **BMC Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 18, 2 dez. 2012.
- ARZOLA-RODRÍGUEZ, S. I. et al. Phenolipids, Amphipilic Phenolic Antioxidants with Modified Properties and Their Spectrum of Applications in Development: A Review. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1–19, 17 dez. 2022.
- BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1942, 10 nov. 2017.
- BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, v. 18, n. 2, p. 139–143, abr. 2011.
- BORGES, F. F. V. et al. Antimutagenic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Activities of *Silybum Marianum* [L.] Gaernt Assessed by the *Salmonella* Mutagenicity Assay (Ames Test) and the Micronucleus Test in Mice Bone Marrow. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 5, p. 848–855, 3 jul. 2016.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRAHMANAIDU, P. et al. Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 221, p. 42–51, set. 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Nacional de Saúde 2020-2023**. Brasília: [s.n.].
- BURKE, A. C. et al. Intervention with citrus flavonoids reverses obesity and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese Ldlr^{-/-} mice. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 9, p. 1714–1728, set. 2018.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Advances in Nutrition**, v. 10, p. S4–S9, jan. 2019.

CHAKHTOURA, M. et al. Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. **eClinicalMedicine**, v. 58, p. 101882, abr. 2023.

COOPER, M. A. et al. Intrinsic Activity of C57BL/6 Substrains Associates with High-Fat Diet-Induced Mechanical Sensitivity in Mice. **The Journal of Pain**, v. 19, n. 11, p. 1285–1295, nov. 2018.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. **Anais...**Basel, Switzerland: MDPI, 1 nov. 1999.

D'AMELIA, V. et al. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 3, p. 611–625, 17 jun. 2018.

DANTAS, M. B. et al. Caffeic acid reduces lipid accumulation and reactive oxygen species production in adipocytes. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, n. 20, p. 263–268, 22 jun. 2018.

DIAS, M. C. et al. The antioxidant system in *Olea europaea* to enhanced UV-B radiation also depends on flavonoids and secoiridoids. **Phytochemistry**, v. 170, p. 112199, fev. 2020.

EBRAHIMPOUR-KOUJAN, S. et al. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. **Phytomedicine**, v. 22, n. 2, p. 290–296, fev. 2015.

EGLOFF, M.-P. et al. The 2.46 Å Resolution Structure of the Pancreatic Lipase-Colipase Complex Inhibited by a C11 Alkyl Phosphonate. **Biochemistry**, v. 34, n. 9, p. 2751–2762, 7 mar. 1995.

ELHASSANEEN, Y. A. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of milk thistle (*Silybum marianum*) extract and their potential roles in the prevention of diet-induced obesity complications. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 70–85, 13 ago. 2023.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, fev. 2004.

FRANCISQUETI, F. V. et al. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 1, p. 85–91, jan. 2017.

FRIEDENREICH, C. M.; RYDER-BURBIDGE, C.; MCNEIL, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 3, p. 790–800, 18 mar. 2021.

GILLESSEN, A.; SCHMIDT, H. H.-J. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. **Advances in Therapy**, v. 37, n. 4, p. 1279–1301, 17 abr. 2020.

GINWALA, R. et al. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 35, 5 fev. 2019.

GIUSTARINI, D. et al. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: Influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 4, p. 141–148, abr. 2011.

GUEDES, J. M. et al. Muscular resistance, hypertrophy and strength training equally reduce adiposity, inflammation and insulin resistance in mice with diet-induced obesity. **Einstein (São Paulo)**, v. 18, p. 1–9, 16 set. 2019.

GUPTA, A.; OSADCHIY, V.; MAYER, E. A. Brain–gut–microbiome interactions in obesity and food addiction. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 655–672, 27 nov. 2020.

HA, X. et al. Free Fatty Acids Promote the Development of Prostate Cancer by Upregulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. **Cancer Management and Research**, v. Volume 12, p. 1355–1369, fev. 2020.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, abr. 1996.

HAMADA, K. et al. Obesity Strongly Promotes Growth of Mouse MC38 Colon Cancer in an Orthotopic-syngeneic C57BL/6 Mouse Model. **In Vivo**, v. 36, n. 4, p. 1643–1646, 2022.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HASANI, A. et al. The role of Akkermansia muciniphila in obesity, diabetes and atherosclerosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 10, 8 out. 2021.

HASHEM, A. Silymarin and management of liver function in nonalcoholic steatohepatitis: a case report. **Drugs in Context**, v. 12, p. 1–5, 1 jun. 2023.

HECK, A. M.; YANOVSKI, J. A.; CALIS, K. A. Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. **Pharmacotherapy**, v. 20, n. 3, p. 270–279, mar. 2000a.

HECK, A. M.; YANOVSKI, J. A.; CALIS, K. A. Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 20, n. 3, p. 270–279, 17 mar. 2000b.

HECK, A. M.; YANOVSKI, J. A.; CALIS, K. A. Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 20, n. 3, p. 270–279, 17 mar. 2000c.

HEIJDEN, R. A. VAN DER et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Ageing**, v. 7, n. 4, p. 256–268, 23 abr. 2015.

HILLS, A. P.; ANDERSEN, L. B.; BYRNE, N. M. Physical activity and obesity in children. **British Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 11, p. 866–870, 1 set. 2011.

HOU, X.-D. et al. Pancreatic lipase inhibitory constituents from Fructus Psoraleae. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 18, n. 5, p. 369–378, maio 2020.

HÜLS, A. et al. Polygenic risk for obesity and its interaction with lifestyle and sociodemographic factors in European children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 6, p. 1321–1330, 22 jun. 2021.

HURR, C. et al. Liver sympathetic denervation reverses obesity-induced hepatic steatosis. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 17, p. 4565–4580, 26 set. 2019.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 1, p. 11–18, 22 jan. 2010.

IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

JIN, X. et al. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 13, n. 6, p. 2403–2424, jun. 2023.

JUCÁ, M. M. et al. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 34, n. 5, p. 692–705, 3 mar. 2020.

KA, S.-O. et al. Silibinin attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes through a potential upregulation of the insig pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 633–637, 6 abr. 2009.

KALEEM, M.; AHMAD, A. Flavonoids as Nutraceuticals. Em: **Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 137–155.

KARIMI, R. et al. Silymarin reduces retinal microvascular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15872, 23 set. 2022.

KHEDIDJA, B.; MADJDA, B.; ABDERRAHMANE, G. Antiallergy Drugs as Potent Inhibitors of Lipase with Structure-activity Relationships and Molecular Docking. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 95–101, 10 dez. 2018.

KLEINERT, M. et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 140–162, 19 mar. 2018.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

LA FLEUR, S. E. et al. The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 5, p. 643–649, 27 maio 2014.

LALANZA, J. F.; SNOEREN, E. M. S. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 122, p. 92–119, mar. 2021.

LEE, E. S. et al. Curcumin analog CUR5–8 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in

mice with high-fat diet-induced obesity. **Metabolism**, v. 103, p. 154015, fev. 2020.

LEE, H. S. et al. Gynostemma Pentaphyllum Extract Ameliorates High-Fat Diet-Induced Obesity in C57BL/6N Mice by Upregulating SIRT1. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2475, 15 out. 2019.

LEUNG, W. Y. S. et al. Weight management and current options in pharmacotherapy: Orlistat and sibutramine. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 58–80, jan. 2003.

LI, M.-M. et al. Structure-activity relationship of dietary flavonoids on pancreatic lipase. **Current Research in Food Science**, v. 6, p. 100424, 2023.

LIM, S. Y.; STEINER, J. M.; CRIDGE, H. Lipases: it's not just pancreatic lipase! **American Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 8, 1 ago. 2022.

LIU, C.-J. et al. Protective Effects of Licochalcone A Ameliorates Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Via Promotion of the Sirt-1/AMPK Pathway in Mice Fed a High-Fat Diet. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 447, 11 maio 2019.

LORENZO, A. DE. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 681–703, 14 jan. 2016.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, nov. 2019a.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, nov. 2019b.

MANCINI, G. **A hipercolesterolemia e o envelhecimento como moduladores do estresse oxidativo em modelo de hipercolesterolemia familiar**. Dissertação—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, fev. 2013.

MARINHO, M. M. et al. Quantum computational investigations and molecular docking studies on amentoflavone. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e06079, jan. 2021.

MARTINEZ-GONZALEZ, A. I. et al. In Vitro Inhibition of Pancreatic Lipase by Polyphenols: A Kinetic, Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Study. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, 2017.

MAYORAL, L.-C. et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 1, p. 11–21, 2020.

MENDES, F. R. S. et al. GABA A and serotonergic receptors participation in anxiolytic effect of chalcones in adult zebrafish. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–19, 16 jan. 2023.

MENTEŞE, E. et al. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some benzimidazole derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 478–486, fev. 2018.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochemical Medicine**, v. 23, n. 3, p. 302–311, jun. 1980.

MILIĆ, N. et al. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). **Natural product communications**, v. 8, n. 12, p. 1801–10, dez. 2013.

NAVARRO, V. J. et al. Silymarin in non-cirrhotics with non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0221683, 19 set. 2019.

NEGRIN, K. A. et al. IL-1 Signaling in Obesity-Induced Hepatic Lipogenesis and Steatosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107265, 12 set. 2014.

NI, X.; WANG, H. Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **American journal of translational research**, v. 8, n. 2, p. 1073–1081, 2016.

NIE, K. et al. Diosgenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes through regulating SIRT6-related fatty acid uptake. **Phytomedicine**, v. 111, p. 154661, mar. 2023.

NISOLI, E.; CARRUBA, M. O. An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action. **Obesity Reviews**, v. 1, n. 2, p. 127–139, out. 2000.

NOOR, Z. I. et al. In Vitro Antidiabetic, Anti-Obesity and Antioxidant Analysis of *Ocimum basilicum* Aerial Biomass and in Silico Molecular Docking Simulations with Alpha-Amylase and Lipase Enzymes. **Biology**, v. 8, n. 4, p. 92, 4 dez. 2019.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

PARIDA, S.; SIDDHARTH, S.; SHARMA, D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 1–27, 22 maio 2019.

PEDROSA, M. R. et al. GLP-1 Agonist to Treat Obesity and Prevent Cardiovascular Disease: What Have We Achieved so Far? **Current Atherosclerosis Reports**, v. 24, n. 11, p. 867–884, 31 nov. 2022.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. **Metabolism**, v. 92, p. 82–97, mar. 2019.

PRADO, W. L. DO et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378–383, out. 2009a.

PRADO, W. L. DO et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378–383, out. 2009b.

QURESHI, K.; ABRAMS, G. A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 26, p. 3540–3553, jul. 2007.

RADAELLI, M.; PEDROSO, R. C.; MEDEIROS, L. F. Farmacoterapia da obesidade: Benefícios e Riscos. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 4, n. 1, 3 maio 2016.

RANA, A. C.; GULLIYA, B. Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n. 1, p. 8–20, 4 jan. 2019.

REINA, M.; MARTÍNEZ, A. Is Silybin the Best Free Radical Scavenger Compound in Silymarin? **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 20, p. 4568–4578, 26 maio 2016.

RITCHIE, H.; ROSER, M. **Obesity - When did obesity increase? How do rates vary across the world? What is the health impact?**

ROMERO-CORRAL, A. et al. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 6, p. 959–966, 19 jun. 2008.

RUZE, R. et al. Obesity, diabetes mellitus, and pancreatic carcinogenesis: Correlations, prevention, and diagnostic implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1878, n. 1, p. 188844, jan. 2023.

SAINI, R. K. et al. Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13643, 20 dez. 2021.

SALAS, X. R. The ineffectiveness and unintended consequences of the public health war on obesity. **Can J Public Health**, v. 106, n. 2, p. 79–81, 3 fev. 2015.

SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 1 jul. 2015.

SAMPAIO, T. L. **Efeito nefroprotetor do (-)- α -bisabolol na lesão renal aguda em modelos de isquemia-reperfusão**. Dissertação—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2016.

SANTOS, K. R. P. et al. **Manual de técnica histológica de rotina e de colorações**. Vitória de Santo Antão, 2021.

SAYIN, F. et al. Effects of Silybum marianum Extract on High-Fat Diet Induced Metabolic Disorders in Rats. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 1, p. 43–49, 31 mar. 2016.

SEEGER, D. R.; MURPHY, E. J. Mouse Strain Impacts Fatty Acid Uptake and Trafficking in Liver, Heart, and Brain: A Comparison of C57BL/6 and Swiss Webster Mice. **Lipids**, v. 51, n. 5, p. 549–560, 21 maio 2016.

SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 17 maio 2010.

SEO, Y.-J. et al. Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 712, 1 jun. 2018.

SHI, X. et al. Allicin Improves Metabolism in High-Fat Diet-Induced Obese Mice by Modulating the Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2909, 2 dez. 2019.

SHITYAKOV, S.; FOERSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, p. 23–36, set. 2014.

SILVA, J. et al. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against Staphylococcus aureus. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 5, p. 177–194, 19 out. 2021.

SILVÉRIO, M. R. S. et al. Plant Natural Products for the Control of Aedes aegypti: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 31 jul. 2020.

SINGH, M. et al. A systematic review of the protective effects of silymarin/silibinin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, p. 88, 10 maio 2023.

SIQUEIRA, E. A. **Avaliação dos efeitos da 1 α ,25-dihidroxitamina D3 (VD3) sobre a neurotoxicidade induzida pela rotenona em células PC12: um modelo in vitro de doença de Parkinson**. Tese—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021.

SMALL, L. et al. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 314, n. 3, p. E251–E265, 1 mar. 2018.

SOWKA, A.; DOBRZYN, P. Role of Perivascular Adipose Tissue-Derived Adiponectin in Vascular Homeostasis. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1485, 12 jun. 2021.

STICKEL, F.; SHOUVAL, D. Hepatotoxicity of herbal and dietary supplements: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 851–865, 14 jun. 2015.

STOLF, A. M.; CARDOSO, C. C.; ACCO, A. Effects of Silymarin on Diabetes Mellitus Complications: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 3, p. 366–374, mar. 2017.

SU, H. et al. Myricetin protects against diet-induced obesity and ameliorates oxidative stress in C57BL/6 mice. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 17, n. 6, p. 437–446, 10 jun. 2016.

SUN, C. et al. Induction of autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by Pueraria flavonoids improves non-alcoholic fatty liver disease in obese mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, p. 114005, jan. 2023.

SUN, Y. et al. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 10, p. 914, 24 out. 2020.

SUOLANG, P.-C. et al. Protective effect and mechanism of Qiwei Tiexie capsule on 3T3-L1 adipocytes cells and rats with nonalcoholic fatty liver disease by regulating LXR α , PPAR γ , and NF- κ B-iNOS-NO signaling pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 236, p. 316–325, maio 2019.

SURAI, P. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 204–247, 20 mar. 2015.

TAJMOHAMMADI, A.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. *Silybum marianum* (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: <sc>A</sc> review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 10, p. 1933–1949, 17 out. 2018.

TOSCA, M. A.; SCHIAVETTI, I.; CIPRANDI, G. Obesity and Asthma: An Intriguing Link in Childhood and Adolescence. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 182, n. 12, p. 1222–1225, 2021.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

TUORKEY, M. J.; EL-DESOUKI, N. I.; KAMEL, R. A. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 28, n. 1, p. 36–43, jan. 2015.

TZOTZAS, T.; KRASSAS, G.; TZIOMALOS, K. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: An update. **Vascular Health and Risk Management**, p. 441–452, maio 2009.

VARI, R. et al. Obesity-Associated Inflammation: Does Curcumin Exert a Beneficial Role? **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 1–13, 22 mar. 2021.

VEERAMACHANENI, G. K. et al. Shape based virtual screening and molecular docking towards designing novel pancreatic lipase inhibitors. **Bioinformatics**, v. 11, n. 12, p. 535–542, 31 dez. 2015.

WADHWA, K. et al. Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 1–50, 21 ago. 2022.

WEST-EBERHARD, M. J. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 3, p. 723–731, 15 jan. 2019.

WU, T. et al. Blueberry and Mulberry Juice Prevent Obesity Development in C57BL/6 Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 15 out. 2013.

XIAO, F. et al. The therapeutic effects of silymarin for patients with glucose/lipid metabolic dysfunction. **Medicine**, v. 99, n. 40, p. e22249, 2 out. 2020.

YAKAIAH, V.; DAKSHINAMOORTHY, A.; TY, S. S. Novel Aspects in Inhibiting Pancreatic Lipase with Potential New Compound from Nutmeg in Connection with Obesity – In Vitro, In Silico, In Vivo and Ex Vivo Studies. **Maedica - A Journal of Clinical Medicine**, v. 16, n. 3, p. 445–452, 15 set. 2021.

YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 1 jul. 2008.

ZHANG, J. et al. Silibinin augments the effect of clopidogrel on atherosclerosis in diabetic ApoE deficiency mice. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 80, n. 4, p. 353–361, 6 abr. 2022a.

ZHANG, S. et al. Anti-obesity effects of corn peptide on 3T3-L1 preadipocytes and C57BL/6J obese mice. **Archives of Animal Nutrition**, v. 76, n. 3–6, p. 205–220, 2 nov. 2022b.

ZHOU, M. et al. Anti-Obesity Effect and Mechanism of Chitooligosaccharides Were Revealed Based on Lipidomics in Diet-Induced Obese Mice. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5595, 23 jul. 2023.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, jan. 2018.

ANEXO I



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito antiobesidade da silimarina em modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6.", protocolada sob o CEUA nº 9214030622 (ID 002332), sob a responsabilidade de **Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes e equipe; Felipe Ramon Cunha da Silva; Emanuel Paula Magalhães** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/11/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the antiobesity effect of silymarin on diet-induced obesity on C57BL/6 mice.", utilizing 70 Isogenics mice (70 males), protocol number CEUA 9214030622 (ID 002332), under the responsibility of **Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes and team; Felipe Ramon Cunha da Silva; Emanuel Paula Magalhães** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 11/08/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2021 a 12/2023

Área: Departamento de Análises Clínicas E Toxicológicas

Origem: Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 5 a 7 semanas

N: 70

Linhagem: C57BL/6

Peso: 18 a 22 g

Local do experimento: Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX)/Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT).

Fortaleza, 21 de novembro de 2022

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará