



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**La complejidad de las plantas medicinales: Cardo mariano,  
pasado, presente y futuro**

Autor: Laura Córdoba González

D.N.I.:05443692Y

Tutor: Paulina Bermejo Benito

Convocatoria: Junio 2015

## 1. RESUMEN

En este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica del Cardo mariano, *Silybum marianum* (L.) Gaertner, una planta medicinal conocida por su efecto hepatoprotector y que ha sido utilizada desde la antigüedad con estos fines. Se describen los principios activos mayoritarios que lo constituyen, su síntesis y sus derivados que han sido utilizados en una amplia gama de ensayos in vitro, in vivo e incluso en humanos para estudiar sus diferentes actividades farmacológicas y así poder confirmar sus posibles indicaciones terapéuticas.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El cardo mariano (*Silybum marianum*) es una planta medicinal que pertenece a la familia *Asteraceae*, también conocido como cardo de Santa María, cardo santo, el cardo de la señora, cardo María o verdadero cardo. Se ha utilizado en la Medicina europea desde hace más de 2.000 años desde los tiempos de Dioscórides y Plinio el Viejo para tratar los problemas del hígado y el tracto biliar. Con múltiples ensayos realizados, es quizás una de las mejores plantas documentadas disponibles para tratar varios tipos de intoxicación del hígado.

El cardo mariano tiene gran variedad de flavonoides como la apigenina, quercetina y taxifolina. Sus propiedades medicinales se encuentran en las paredes de los frutos maduros (aquenios), y se atribuyen a la silimarina, que es una mezcla de compuestos denominados flavonolignanos. Estos compuestos son considerados altamente lipofílicos y relativamente estables<sup>1</sup> En los últimos años, se han publicado en la base de datos de Pubmed alrededor de 400 documentos sobre los efectos hepatoprotectores, antioxidantes y quimiopreventivos de estos compuestos.

La silimarina ha sido utilizada para el tratamiento de trastornos hepáticos asociados con el consumo de alcohol, la hepatitis viral crónica y aguda, y los fallos hepáticos inducidos por toxinas de *Amantia phalloides* desde su descubrimiento en 1960. Aparte de la naturaleza hepatoprotectora, que se debe principalmente a sus propiedades antioxidantes y regeneradoras de tejidos, la silimarina se puede utilizar para los trastornos de la vesícula biliar, ictericia, enfermedades de la piel que implican una disfunción hepática, protección de las células normales durante quimioterapia, tratar la hipercolesterolemia, las náuseas del embarazo, aumentar la secreción en la lactancia, neuroprotector contra muchas enfermedades neurológicas incluyendo las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y la isquemia cerebral.

Esta planta se incluyó desde 1986 entre las monografías positivas de la Comisión E de Alemania, que constituyó una guía, en la cual se evaluaba la seguridad y eficacia de plantas medicinales con utilidad terapéutica y concedía un respaldo para ser prescritas en Alemania. Según esta monografía

aprobada, el cardo mariano es útil en el daño hepático por tóxicos; tratamiento de apoyo en inflamación crónica de enfermedades hepáticas y cirrosis hepática.<sup>2</sup> En el año 2010 fue incluida por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en la lista de sustancias y preparados vegetales para su uso como medicamentos tradicionales a base de plantas medicinales.<sup>3</sup>

Los suplementos de cardo mariano ocupan el séptimo puesto en los suplementos a base de plantas más vendidos en 2011, por lo que el consumo en la actualidad es bastante elevado y esto significa que esta planta tiene una gran importancia económica ya que desde algunos años se encuentra dentro de la lista de las 10 plantas más vendidas.

Como ya hemos mencionado, se conoce a esta planta por su efecto hepatoprotector principalmente. El hígado es un órgano importante que tiene un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis, es responsable de múltiples funciones metabólicas y procesos fisiológicos tales como la producción de bilis, la generación de energía, el almacenamiento de vitaminas, y el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, y lípidos. Muchas personas han sido afectadas con algún tipo de lesión hepática. Ejemplos de las lesiones hepáticas son el hígado graso, la esteatosis no alcohólica, la hepatitis A, B, o C, cirrosis y el hepatocarcinoma (la tercera causa de mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo). Las enfermedades hepáticas son causas primarias de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El más reciente informe de vigilancia publicado por el Instituto Nacional sobre el Abuso de Alcohol y Alcoholismo mostró que la cirrosis hepática fue el 12 de las principales causas de muerte en el mundo. Las enfermedades hepáticas se agravan por los estilos de vida poco saludables, la obesidad y el consumo excesivo de alcohol y las drogas. (WHO, 2015)

Hoy en día, existe un gran vacío terapéutico para tratar las enfermedades hepáticas. Por lo tanto, el uso de esta planta y de sus componentes podría constituir el principal tratamiento para dichos trastornos hepáticos.

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica de la planta medicinal del Cardo mariano indicando su descripción, composición química, propiedades farmacológicas de sus compuestos, los estudios farmacológicos experimentales así como los ensayos clínicos disponibles a fin de confirmar sus posibles indicaciones terapéuticas.

### **4. METODOLOGÍA**

Para realizar el trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica a partir de artículos recogidos en bases de datos como Pubmed, Toxnet, SciELO, así como sitios web de la EFSA y la EMA.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **5.1 Historia del Cardo Mariano**

El uso más antiguo que se conoce de la leche de cardo fue registrado por Dioscórides, que recomendó la planta como un tratamiento para las picaduras de serpiente. Plinio el Viejo (23-79 dC) informó que el jugo de la planta mezclado con miel estaba indicado para "llevarse la bilis". En la Edad Media, el cardo mariano era recomendado como un antídoto para las toxinas del hígado. El médico británico Culpeper en el siglo XVII informó que era eficaz para aliviar las obstrucciones del hígado. En 1898, los médicos eclécticos Felter y Lloyd indicaron que la planta era buena para la congestión del hígado, el bazo y los riñones.<sup>4</sup>

### **5.2 Descripción Botánica**

Hierba anual o bienal, perteneciente a la familia Asteráceas, con un tallo de 20-150 m de altura, verde, glabroso y ligeramente aracnoide pubescente, erecto acanalado y ocasionalmente ramificado. Hojas alternadas, largas, verde lustrosas, blanca nervadas o jaspeadas, glabrosa con márgenes fuertemente espinoso, oblongas, sésiles, hojas basales (25-50 cm de longitud, 12-25 cm de ancho) caulinas, pinatifidas. Inflorescencia grande y solitaria, compuesta de rojo púrpura, hermafrodita, floretes tubulares reunidos dentro del capítulo semiesférico (2,5-4,5 cm de diámetro), metido en una envoltura con brácteas espinosas externos. Hace su aparición desde finales de verano hasta principios de otoño. Cada inflorescencia produce aproximadamente 100 semillas, y cada planta produce entre 10 y 50 capítulos por planta, con una media de 3.000 semillas por planta, las cuales pueden permanecen viables durante 9 años o más.<sup>5</sup>

Frutos en aquenio encorvado ovoidal, fuertemente comprimidas, de 6-7 mm de longitud, 3 mm de ancho y 1,5 mm de espesor, de color café brillante al madurar, con pequeñas manchas jaspeadas, compuestas de 6-8 semillas blancas que presentan un tegumento duro, con un mechón sedoso (15-20 mm de diámetro).<sup>5</sup>

La parte usada son los frutos secos y maduros, desprovistos de papo, y menos comúnmente las partes aéreas.

### **5.3 Hábitat**

Originaria de una zona estrecha del Mediterráneo, se ha cultivado desde hace siglos en toda Europa. También crece en la India, China, África y Australia y fue llevada a América del Norte y América del Sur por los colonizadores europeos durante el siglo XIX.<sup>5</sup>

## 5.4. Cultivo

El cardo mariano crece sobre suelos poco fértiles, pedregosos o rocosos, campos infértiles, al costado de los caminos, preferentemente bien iluminados y hasta una altura cercana a los 1.000 m. La siembra se produce en otoño y primavera, y la distancia entre filas es generalmente 40-75cm, con 20-30cm entre las plantas de la fila. Los requerimientos nutricionales de este cultivo son bajos-moderados, ya que se adapta a suelos de baja calidad y a muchas condiciones de crecimiento diferentes. El contenido de silimarina, a menudo varía de 1,0% a 3,0% en los aquenios pero puede exceder al 8%. Se deben hacer esfuerzos para desarrollar variedades con alto contenido de silimarina. El estrés por sequía mejora la acumulación de la silimarina en las semillas. Las plantas que crecen bajo tratamientos moderados y severos de estrés por sequía contienen una mayor cantidad de silimarina (17%) que las cultivadas en condiciones de riego (4% de silimarina) y un aumento de la proporción de silibina, que posee el mayor grado de actividad biológica entre los componentes silimarina.<sup>6</sup>

## 5.5 Controles de calidad

Según la Real Farmacopea Española, 2005, el fruto maduro, desprovisto de papo, de *Silybum marianum* (L.) Gaertner debe tener como mínimo 1,5 por ciento de silimarina, expresado en silibina (C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>; Mr 482,4) sobre droga desecada. No debe tener olor rancio. Se indican las características microscópicas, los ensayos de cromatografía en capa fina y los ensayos de cuantificación de los principios activos, de los elementos extraños, pérdida por desecación y las cenizas totales de los frutos maduros.<sup>7</sup>

## 5.6 Composición química

Los principales constituyentes químicos presentes son:

**Flavonolignanos:** Se encuentran exclusivamente en el tegumento del fruto; (1,5-3,0%), conocidos colectivamente como silimarina. Los mayores constituyentes del complejo silimarina son los cuatro isómeros silibina e isosilibina (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros), silicristina y silidianina (figura 2). Otros

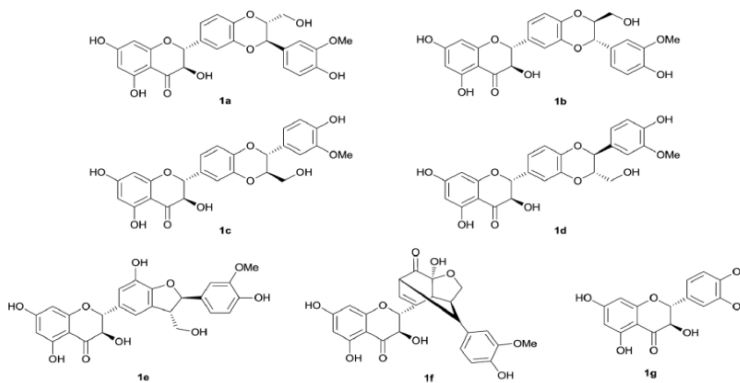


Fig. 2 Major silymarin components: silybin A (1a), silybin B (1b), isosilybin A (1c), isosilybin B (1d), silychistin A (1e), silydianin (1f) and taxifolin (1g).

flavonolignanos identificados incluyen 2,3-dihidrosilibina, 2,3- dihidrosilicristina, silihermina, neosiliherminas, silimonina y silandrina.<sup>4</sup>

**Flavonoides:** La mayoría se encuentran en las hojas; quercetina, taxifolina (un 2,3 dihidroflavonol), apigenina, luteolina, dehidro-kempferol B.

**Otros:** Histamina, tiramina, taninos, aceite esencial, esteroides (betasitosterol, campesterol, estigmasterol), azúcares (arabinosa, ramnosa, xilosa, glucosa), ácidos orgánicos, poliactenos (raíz), lípidos (20-30%, siendo el ácido linoleico el componente mayoritario), vitaminas (C, E y K), proteínas (2%)<sup>5</sup>

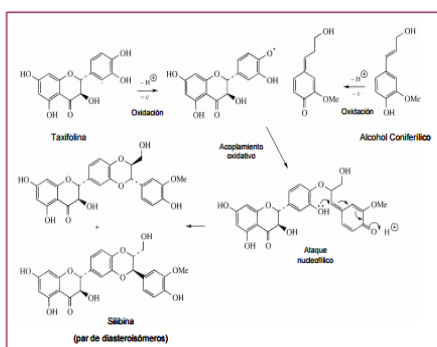


Figura 3. Síntesis de silibina por acoplamiento oxidativo entre taxifolina y alcohol coniferílico.

Los flavonolignanos se forman por una reacción de acoplamiento oxidativo entre el flavonoide taxifolina y un fenilpropanoide, generalmente el alcohol coniferílico. Estas estructuras derivan de dos de las principales rutas del metabolismo primario, la ruta del ácido siquímico y la ruta del acetato.

Tomado de: Ortega L. 2012

La silibina es una mezcla aproximadamente equimolar de dos diastereómeros: silibina A (1a), y silibina B (1b) donde, típicamente, 1b es ligeramente prevalente en la mayoría de las preparaciones.

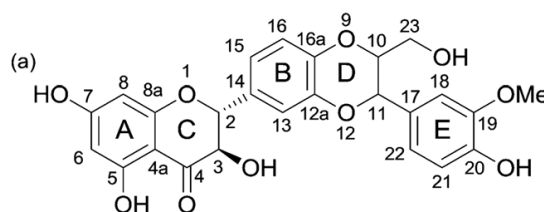
Los métodos de extracción utilizados para extraer los flavonolignanos son la maceración a temperatura ambiente, la extracción ultrasónica asistida, y el reflujo. A pesar de que la extracción mediante maceración da el mayor contenido de silibina en el extracto, la tasa de producción es desfavorable y es necesario un tiempo mayor debido a la mala transferencia de masa. La extracción asistida por ultrasonidos se aplica a nivel industrial. Por lo tanto, el método de reflujo se considera como el método de extracción de elección para estos compuestos y requiere el uso de disolventes orgánicos tales como metanol, acetona y / o acetonitrilo.<sup>8</sup>

### Propiedades químicas de silibina

La silibina puede ser caracterizada como una molécula pequeña, altamente funcionalizada con carbo-heterociclos.

Generalmente, la silibina es estable bajo condiciones ácidas de Brønsted, pero no es estable en presencia de ácidos de Lewis o en condiciones básicas.<sup>4</sup>

La molécula es muy resistente a la reducción, pero se oxida fácilmente a 2,3 dehidrosilibina.



Tomado de Biedermann, D. et al 2014

Los cinco grupos hidroxilo de silibina son los objetivos principales de la derivación. Estos grupos hidroxilo pueden ser divididos en tres categorías según su naturaleza: tres fenólicos, uno secundario y un grupo alcohólico primario. De los grupos hidroxilo fenólicos, el grupo hidroxilo en la posición C-5 es de alguna manera excepcional debido a su fuerte enlace de hidrógeno con el grupo oxo adyacente. El grupo oxo es la conjugación con el anillo aromático y actúa como un donante de par de electrones libres para el enlace de hidrógeno con el grupo 5-OH. Los otros dos grupos hidroxilo fenólicos son similares en el comportamiento, el grupo OH C-7 es más reactivo que el grupo 2-OH debido a una menor impedimento estérico y la presencia del enlace de hidrógeno. El grupo alcohólico primario en C-23 puede ser fácilmente esterificado y oxidado a un ácido carboxílico.<sup>4</sup>

### **Propiedades físicas de la silibina**

Aunque la silibina contiene varios grupos ionizables hidrófilos, su carácter general es hidrófobo y su solubilidad en agua es baja. Es poco soluble en disolventes próticos polares (EtOH, MeOH) e insoluble en disolventes no polares (cloroformo, éter de petróleo), pero sí es soluble en disolventes apróticos polares (acetona, DMF, THF).<sup>4</sup>

La solubilidad de silibina se estudió en 1980 por Koch y Zinsberger y más tarde en 2007 por Bai et al. La solubilidad de la silibina en agua aumenta considerablemente con el pH y moderadamente con la temperatura.<sup>4</sup>

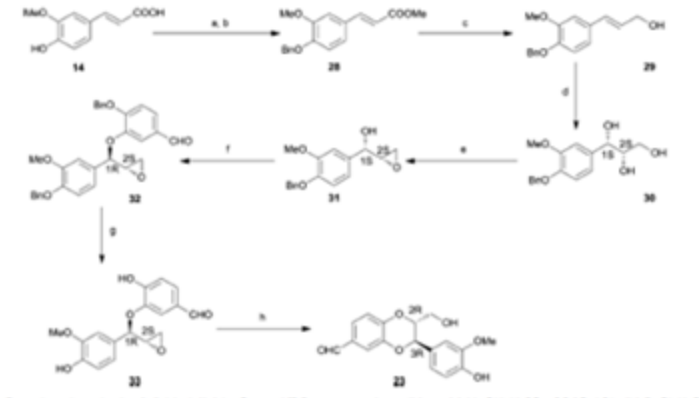
### **Estructura de la silibina**

La silibina fue aislada por primera vez por Möschlin en 1959. Un año más tarde, Janiak y Hansel fueron los primeros en publicar el aislamiento de los flavonoides del extracto de *S. marianum* como sustancias *Silybum* E5 y E6. Los autores fueron los primeros en llamar sustancia E6 "Silibina" y descubrieron que la silibina cuenta con cinco grupos hidroxilo que pueden ser acetilados, y de tres grupos hidroxilo que pueden ser metilados.<sup>4</sup>

En 1968, se establecen las configuraciones relativas a todos los centros estereogénicos de la molécula y se sugiere un acoplamiento oxidativo entre la taxifolina y el alcohol coniferílico como una ruta biosintética plausible de la silibina. Unos años más tarde, en 1979 se reconoció a la silibina como una mezcla de dos diastereoisómeros (1a y 1b). La publicación de los datos de difracción de rayos X por Lotter y Wagner confirmó la existencia de los dos diastereoisómeros de silibina. Se puede proceder a la separación de los dos diastereoisómeros mediante la combinación de acilación enzimática y alcoholólisis utilizando lipasas (Novozym 435) con altos rendimientos y alta pureza (silibina A (1a): rendimiento 42%, > 95% de pureza; silibina B (1b): 67% de rendimiento, 98% de pureza).<sup>4</sup>

## Síntesis total de silibina

Los esfuerzos sintéticos hacia la silibina concluyeron en el año 2000 por la síntesis enantioselectiva total de ambos, la silibina A (1a) y la silibina B (1b) a partir de ácido ferúlico y el uso de la oxidación Sharpless como el paso clave.<sup>4</sup>



Tomado de Biedermann, D. et al, 2014

## 5.7 Productos de semisíntesis

### Ésteres

Aproximadamente se han preparado 60 ésteres diferentes de silibina para descubrir nuevos derivados biológicamente activos. Muchos ésteres pueden ser fácilmente hidrolizados en los tejidos por diversas esterasas. Sin embargo, el efecto biológico de estos ésteres está fuertemente pronunciado in vitro, podría ser perdido in vivo por la acción de estas enzimas. Esto es apoyado por el estudio de Koch y Tscherny donde informan de la hidrólisis completa de hemisuccinato bis silibina por las esterasas de hígado de bovino en 30 min. Por otro lado, los flavonoides incluyendo la silibina pueden inhibir lipasas o esterasas, aumentando la estabilidad de los ésteres.<sup>4</sup>

### Acetatos

A partir de los acetatos publicados hasta el momento, la silibina pentaacetato y la silibina 23-acetato están fácilmente disponibles. La preparación de otros acetatos es bastante laboriosa pero puede abrir el acceso a derivados protegidos selectivamente. La silibina 23-O-acetato ha adquirido importancia como material de partida para la resolución de los diastereómeros de la silibina y es fácilmente accesible por la esterasa Novozym435.<sup>4</sup>

### Hemisuccinatos

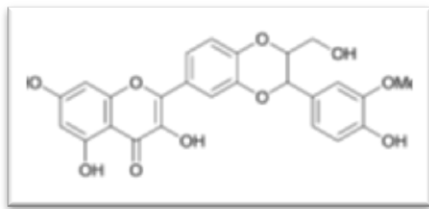
La 3,23- bishemisuccinato sibilina se utiliza clínicamente para el tratamiento de la intoxicación severa por *Amanita phalloides*. La silibina posee la capacidad de bloquear la captación de toxinas en los hepatocitos,



pero su uso se ve obstaculizado por la falta de disponibilidad oral y de solubilidad en agua. Por lo tanto, este compuesto se utiliza por vía intravenosa (Legalon SIL®).<sup>4</sup>

## Oxidaciones

El derivado oxidado más importante es la 2,3-dehidrosilibina. Varios motivos estructurales de la silibina y 2,3-dehidrosilibina se distinguen por sus actividades anti-radicalarias, que han sido bien documentados en varios estudios de estructura- relación de la actividad. Dos patrones básicos estructurales se pueden encontrar en la estructura de los flavonoides: la presencia de un grupo catecol en el anillo B, y la asociación del grupo 3-OH con el enlace 2,3-doble y un grupo carbonilo en C-4. El sistema conjugado de dobles enlaces es capaz de estabilizar los radicales libres por deslocalización. La actividad antioxidante de los grupos funcionales de la silibina y 2,3-dehidrosilibina se estudiaron por primera vez por Gaz'ak et al. Los autores prepararon derivados protegidos selectivamente con uno o más grupos hidroxilo (s) libres y determinaron su actividad antioxidante.<sup>4</sup>



2,3-dehidrosilibina

Sobre la base de la prueba de DPPH, el grupo 20-OH se estableció como la fracción más activa de captación de radicales y el grupo más importante responsable de la actividad inhibitoria de la lipoperoxidación.

Generalmente, la 2,3-dehidrosilibina es más lipófilo y la silibina menos soluble en agua. Debido a que el doble enlace 2,3 contribuye a la potencia antioxidante, 2,3-dehidrosilibina es mejor antioxidante que la silibina. En concreto, se trata de 25 veces mejor antiradicalario y 10 veces mejor inhibidor de la peroxidación lipídica que la silibina.<sup>4</sup>

## Glucosidaciones quimio-enzimáticas

Los glucuronidos de silibina son metabolitos importantes de la biotransformación de Fase II. La silibina es rápidamente metabolizada principalmente por glucuronato y conjugada con sulfato.

La glucuronidación de la silibina A (1a) se realizó por la glucuroniltransferasa de hígado ovino. El principal conjugado obtenido fue el 20-OBD-glucuronido sibilina, y en una cantidad inferior se formó el 7-OBD-glucuronido A. La actividad antioxidante de estos compuestos fue mayor que la silibina.<sup>4</sup>

## 5.9 Farmacología

La mayoría de los estudios farmacológicos experimentales han sido realizados usando preparaciones estandarizadas de silimarina, o de su mayor constituyente, la silibina.

## Farmacología Experimental: Ensayos *in vitro* e *in vivo*

Desde el pasado, el cardo mariano se ha utilizado con fines colagogos y galactogogos. Este último efecto no había sido estudiado hasta el 2010 por la EFSA en la cual se utilizaba un extracto de *Silybum marianum* llamado silimarina BIO-C® (extracto seco estandarizado de 40-80% de silimarina) como galactogogo, con el fin de aumentar la secreción de leche materna para las mujeres que no tengan una alta producción de leche durante la lactancia. Este efecto se estudió mediante dos ensayos clínicos (uno publicado en el que participaron 50 mujeres, y otro no publicado) y tres ensayos con animales de experimentación. El ensayo publicado concluyó que no se había establecido una relación de causa y efecto entre el consumo de silimarina BIO-C® y el aumento de la producción de leche materna después del parto.<sup>9</sup>

El cardo mariano se ha conocido por su actividad hepatoprotectora desde los tiempos de Dioscórides y Plinio el Viejo. En la actualidad hay múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* en animales que demuestran las actividades farmacológicas de los flavonolignanos en el hígado.

Una de las actividades destacadas de la silibina es que aumenta la velocidad de síntesis del RNA ribosomal en un 20% en el hígado de ratas, ya que actúa sobre la vía activación de DNA dependiente de la RNA polimerasa I. La silibina une la subunidad regulatoria de DNA-dependiente de RNA polimerasa I al sitio de unión del estrógeno, de tal modo que actúa como un esteroide natural, y así activa la enzima y aumenta la velocidad de la síntesis de RNA ribosomal. Este aumento de la síntesis de RNAr en el hígado estimula la formación de ribosomas maduros, y por lo tanto la biosíntesis de proteínas. Esta acción tiene importantes implicaciones terapéuticas en la reparación de los hepatocitos dañados y en la restauración de las funciones normales del hígado.<sup>5</sup>

Con respecto al hígado, se ha observado *in vitro* que la silibina inhibe la hepatotoxicidad inducida por compuestos como el paracetamol (acetaminofeno, causante de necrosis centrolobulillar hepática a altas dosis), amitriptilina, tetracloruro de carbono, etanol, estolato de eritromicina, galactosamina, tioacetamida, microcistina (un heptapéptido producido por el alga verde-azulada *Microcystis aeruginosa*), radiaciones gamma, nortriptilina y terbutil hidroxiperóxido, en hepatocitos de rata.<sup>5</sup>

La administración intraperitoneal o intragástrica de silimarina (15-800 mg/Kg de peso corporal) a perros, ratones y ratas previenen el daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono. Este efecto de la silimarina fue atribuido a la actividad antioxidante, a una disminución en la activación metabólica del tetracloruro de carbono, y a la estabilización de las membranas de los hepatocitos. También esta vía de administración inhibe el daño hepático inducido por paracetamol, toxinas de *Amanita phalloides* (ejemplo faloidina y  $\alpha$ - amanitina), etanol, galactosamina, halotano, hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales de tierra (ejemplo cerio, praseodimio y lantano) y talio en varios modelos de roedores. Además, la administración intravenosa de la sal de silibina como hemisuccinato de sodio (50 mg/kg de peso corporal) a

perros junto con dosis subletales de *Amanita phalloides* (85 mg/kg de peso corporal) previno el aumento en la concentración de enzimas hepáticas en sangre y disminuyó los factores de coagulación.<sup>5</sup>

En un trasplante experimental, realizado en el hígado de cerdo, el cual fue sometido a isquemia inducida por frío, la administración intravenosa de 500 mg de éster de silibina seguido de 400 mg/L durante el almacenamiento frío y 100 mg/h durante la perfusión, redujeron el daño histológico de las células hepáticas y mejoró la función hepática durante la perfusión de un 24 a un 66%.<sup>5</sup>

También se ha estudiado el uso del cardo mariano para el tratamiento de la hepatitis C. Los compuestos extraídos de la silimarina han sido examinados en líneas celulares infectadas con el virus de la hepatitis C. Se ha demostrado que la silimarina inhibe la replicación de una cepa del genotipo 2a del VHC en cultivos de células de hepatocarcinoma. Los niveles de estrés oxidativo, los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducidos por el VHC se vieron afectados por el tratamiento con silibina.<sup>10</sup>

A pesar de los efectos antivirales de la silimarina contra el virus de la hepatitis C *in vitro* e *in vivo*, el mecanismo no se conoce de manera completa. En conjunto, los datos apoyan un papel importante en la inhibición de la entrada del virus. Curiosamente, el perfil antiviral de Legalon SIL® se asemeja al del IFN durante la primera fase, que es caracterizada por una rápida disminución de los niveles de ARN viral en suero. La segunda fase de disminución inducida por Legalon SIL® no es dependiente de la dosis y se asemeja a la de un inhibidor de la polimerasa NS5B del virus. El Legalon SIL® parece inducir las dos clases de perfiles de ARN virales de desintegración, lo que sugiere la posibilidad de que actúe como antiviral de manera directa (probablemente por inhibición RdRp y pasos posteriores en la liberación de viriones) y los mecanismos de entrada del virus contribuyen a los efectos anti-VHC del Legalon SIL®. La silimarina, Legalon SIL® y silibina también parecen inhibir la liberación del virus a la progenie, por lo que es posible que estos compuestos se dirijan a otros pasos en el ciclo de vida del virus que dependen de las funciones de la célula hospedadora. Por lo tanto, se deben llevar a cabo estudios adicionales con el fin de entender de manera más clara los mecanismos antivirales de estos compuestos sobre el virus de la hepatitis C.<sup>11</sup>

Por otra parte, se ha observado que la silimarina y la silibina tienen actividad antioxidante *in vitro*; ya que ambas reaccionan con los radicales libres de oxígeno, como los aniones hidroxilo, radicales fenoxi y ácido hipocloroso en varios sistemas de modelos como plaquetas humanas, fibroblastos humanos, microsomas y mitocondrias de hígado de ratas. También se ha demostrado *in vitro* la inhibición del AMP cíclico dependiente de fosfodiesterasa por silibina, silidianina y silicristina. Desde que es conocido que el AMP cíclico estabiliza las membranas lisosomales, un aumento en la concentración de este nucleósido se ha propuesto como mecanismo de estabilización de membrana y así actúa la actividad antiinflamatoria de la silimarina. La silibina también inhibe la síntesis y la interrupción *in vitro* de fosfolípidos de las membranas del hígado de ratas, y corrige la alteración en el metabolismo de fosfolípidos en ratas tratadas con etanol.<sup>10</sup>

También se atribuye a la silimarina y a la silibina una actividad antiinflamatoria *in vitro* ya que son capaces de inhibir la actividad de la lipooxigenasa y de la prostaglandina sintetasa. Además el efecto antiinflamatorio de la silimarina previene la activación del NF-kB, la reducción de los niveles del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) *in vitro*.<sup>12</sup>

El cardo mariano también presenta una actividad hipolipemiante, en varios estudios se ha observado una disminución de colesterol y de fosfolípidos tras una administración intraperitoneal de silibina en dosis de 100 mg/Kg durante una semana de tratamiento. En otro estudio, también realizado en ratas, la silimarina demostró incrementar los niveles de HDL colesterol y descender los depósitos de colesterol hepáticos.<sup>12</sup>

Hoy en día, los efectos del cardo mariano que más se están estudiando y publicando artículos son por sus posibles acciones para tratar el cáncer de piel, cáncer de próstata, el hepatocarcinoma, cáncer de pulmón, de ovario y de colon.

Se han estudiado las diferentes dianas moleculares de la silimarina para la prevención del cáncer. La silimarina interfiere con la expresión de los reguladores del ciclo celular y con las proteínas involucradas en la apoptosis. Por lo tanto, puede modular el equilibrio entre la supervivencia celular y la apoptosis. La silibina inhibe la actividad de la protein quinasa MEK-1/2 y de la quinasa ribosomal S6 (RSK2) en células de melanoma. El tratamiento de células de melanoma con silibina atenúan la fosforilación de la señal extracelular-quinasa regulada (ERK) -1/2 y RSK2, que está regulado por las quinasas MEK1 / 2. El bloqueo de la señalización de MEK1 / 2-ERK1 / 2-RSK2 por silibina resultó en la reducción de la activación de factor nuclear kappa B (NF-kB), activador de la proteína-1, y STAT3. Estas proteínas son reguladores transcripcionales de varios genes proliferativos en melanomas. La silibina bloquea la activación de estos factores de transcripción e induce la detención del ciclo celular en la fase G1, que inhibe el crecimiento celular del melanoma *in vitro* e *in vivo*. La silimarina suprime el estrés oxidativo inducido por radiación ultravioleta (UVA) que puede inducir daños en la piel. Por lo tanto, la aplicación tópica de la silimarina puede ser una estrategia útil para proteger contra el cáncer de piel.<sup>10</sup>

En un estudio efectuado en modelos de cáncer de próstata de ratas (líneas H-7, I-8, I-26) se demostró los efectos apoptóticos de la silibina (100  $\mu$ M/24 hrs) evidenciada por una fuerte inhibición de la síntesis de ADN y detención del ciclo mitótico en fases S y G1.<sup>5</sup>

A nivel dermatológico, existen preparados con *Silybum marianum* y fosfolípidos, cuya finalidad es contrarrestar el efecto de los radicales libres sobre la piel. Por otra parte, se pudo constatar que dichos principios activos ejercen un fuerte efecto inhibitorio sobre la enzima AMP cíclico-fosfodiesterasa, la cual suele estar aumentada en procesos inflamatorios tales como dermatitis atópica y psoriasis.<sup>5</sup>

En estos momentos también se está estudiando una posible actividad neuroprotectora de la silibina para poder ser usadas en el tratamiento y prevención de algunos procesos neurodegenerativos o neurotóxicos, particularmente debido a su actividad antioxidante. Esta actividad necesita la realización de más estudios para poder avalar dicha actividad.<sup>14</sup>

Otra posible actividad del cardo mariano es la actividad nefroprotectora, ya que se ha visto que en células renales dañadas in vitro por paracetamol, cisplatino y vincristina se demostró que la administración de silibina puede reducir o evitar los efectos nefrotóxicos. Aunque es necesario realizar más estudios.<sup>15</sup>

La silibina puede ser muy efectiva en la aplicación cardioprotectora durante el tratamiento con fármacos cardiotoxicos, por ejemplo la doxorubicina. La silibina protege del estrés oxidativo producido por este fármaco, porque se produce un efecto estabilizador de la membrana y del potencial de eliminación de los radicales.<sup>16</sup>

Otra actividad que se encuentra en estudio en la actualidad es la actividad antibacteriana de los flavonolignanos que han demostrado su potencial terapéutico al combinarse con antibióticos, especialmente con los aminoglucósidos, ya que se produce un efecto sinérgico. La silibina posee la capacidad de formar complejos con proteínas extracelulares solubles que se unen a la pared celular bacteriana alterando la permeabilidad de la membrana celular, favoreciendo así la penetración de los antibióticos.<sup>17</sup>

## **Ensayos clínicos**

Existen un gran número de ensayos clínicos que han sido publicados en los últimos 15 años. La evidencia sugiere que los extractos de cardo mariano tienen una importante acción hepatoprotectora y anticancerígena.

El más reciente meta-análisis publicado por la base de datos Cochrane en la que incluyen 13 ensayos clínicos con 915 pacientes, concluye que el cardo mariano no parece influir significativamente en el curso de la enfermedad en pacientes con hepatitis B alcohólica y / o hepatitis C. Sin embargo, todas las causas de mortalidad se redujeron en un 50% en pacientes con enfermedad hepática alcohólica y sin hepatitis C (VHC) que tomaron extractos de silimarina en comparación con placebo ( $p < 0,05$ ). La calidad de estos ensayos fue baja, y es difícil decir si se ha producido por la mala calidad científica de los métodos de estudio, la mala calidad de la información, o ambos. A pesar de los informes negativos, el cardo mariano parece tener algún efecto en las enfermedades crónicas del hígado, hepatitis inducida por alcohol, enfermedad hepática inducida por toxinas y enfermedad hepática viral.<sup>18</sup>

***Hepatitis Inducida por Alcohol:*** La eficacia de una preparación estandarizada de silimarina (80%) para el tratamiento de la cirrosis inducida por alcohol fue determinada en 6 ensayos clínicos multicéntricos placebo-control que comenzaron en 1997. La mayoría de estos estudios tenían entre 50 y 100 pacientes. Los pacientes generalmente recibieron una dosis oral de 280-420 mg (140 mg 2 o 3 veces al día) de una

preparación estandarizada de silimarina o placebo. Los resultados de estos estudios mostraron una disminución en la mortalidad de pacientes tratados con silimarina en comparación con el placebo ( $P < 0,05$ ). Después del tratamiento con la preparación de silimarina, fueron observadas una disminución en la bilirrubina total, enzimas hepáticas y niveles séricos del propéptido de colágeno N-terminal tipo III. A 6 meses del ensayo doble ciego se determinó la eficacia de silimarina en pacientes con hepatitis alcohólica crónica. El tratamiento con silimarina mejoró la histología, proliferación de linfocitos y peroxidación lipídica. Por lo que se deduce que en la actividad hepatoprotectora juega un papel muy importante la función antioxidante de los flavonolignanos. Asimismo, los otros flavonolignanos (silicristina, silidianina e isosilibina) también han demostrado actividad antioxidante, pero de tipo dosis dependiente y de menor envergadura que la silimarina.<sup>19</sup>

En 2 estudios realizados en Alemania dirigido por Berenguer que también fueron randomizados y doble ciego, el tratamiento de 163 pacientes con la preparación de silimarina disminuyó los niveles séricos de enzimas hepáticas, mejoró la función hepática, en comparación con el placebo. Después de 1 año de tratamiento (420 mg diariamente), los resultados histopatológicos mostraron mejoría en el grupo tratado en comparación con el grupo que recibió el placebo.<sup>20</sup>

**Hepatitis Viral Aguda o Crónica:** Un estudio doble ciego multicéntrico de 12 meses que comenzó en Mayo 2008 en 4 centros de Estados Unidos, los ensayos placebo-control determinaron la eficacia de silimarina en el tratamiento de la hepatitis crónica, con o sin cirrosis, en 154 pacientes. Los pacientes fueron tratados con 420 mg de una preparación estandarizada de silimarina (80%) o placebo diariamente durante 3-12 meses. La evaluación de los niveles séricos de bilirrubina y enzimas hepáticas no reveló ninguna diferencia significativa en la función hepática entre el grupo tratado y el grupo control. Sin embargo, las mejorías histológicas fueron notadas en pacientes quienes recibieron silimarina.<sup>21</sup>

**Hepatitis Inducida por Compuestos Orgánicos:** Un estudio clínico controlado realizado en Hungría publicado en la revista Acta Medica Hungarica de pacientes con una exposición ocupacional, de 5-20 años, a vapores de tolueno y/o de xileno se llevó a cabo para determinar la eficacia de una preparación estandarizada de silimarina sobre la función hepática. Treinta pacientes fueron tratados oralmente con 140 mg de la preparación a tres tiempos diariamente por 30 días, y los resultados fueron comparados con 19 controles semejantes no tratados. La función hepática y el recuento de plaquetas mejoraron en los pacientes tratados (la elevación de los niveles séricos de la transaminasa glutámico oxalacética y la transaminasa glutámico pirúvica fueron reducidas y los números de plaquetas aumentaron) en comparación con los controles.<sup>22</sup>

**Hepatitis Inducida por Toxinas:** Numerosos casos reportados han indicado que la silimarina y silibina son efectivas en el tratamiento de envenenamiento por *Amanita phalloides*. Sus toxinas inhiben la actividad de la RNA polimerasa en los hepatocitos, causando la muerte celular después de 12-24 horas. La silibina actúa

desplazando competitivamente a la toxina de la enzima, a la vez que reactiva el proceso de síntesis proteica. Los resultados benéficos se dan siempre y cuando se administre la silimarina antes de los 30 minutos de haber ingerido el tóxico, ya que después, el porcentaje de eficacia es muy bajo.

En enero de 2007, 6 miembros de una familia en California sufrieron una intoxicación por *Amanita phalloides* y fueron tratados con Legalon Sil® que fue proporcionada por Madaus Pharma (Bruselas, Bélgica). Sólo 1 de los 6 pacientes murieron, y todos los demás tuvieron una recuperación completa después del tratamiento.<sup>23</sup>

En otro estudio llevado a cabo en Europa sobre 220 casos de envenenamiento por *Amanita phalloides* se pudo constatar que la administración del extracto acuoso de silimarina por vía intravenosa determinaba una tasa de mortalidad inferior (12,8%) comparada a la tasa observada en tratamientos convencionales(22,5%).<sup>21</sup>

La evaluación de los ensayos clínicos de silimarina para el tratamiento de la hepatitis inducida por alcohol, drogas o toxinas, y hepatitis viral aguda o crónica debe ser interpretada con precaución por el pequeño número de pacientes implicados, la heterogeneidad de la diagnosis y los parámetros de resultados, y el inconsistente registro de la ingesta de alcohol por parte de los pacientes durante los estudios.

**Actividad Anticancerígena:** Además de la actividad citoprotectora de la silibina mediada por sus propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales también han sido descubiertas nuevas funciones basadas en la interacción con receptores específicos. Estos han sido estudiados a nivel molecular y la modulación de diversas vías de señalización celular con la silibina, por ejemplo, NF-κ B, la inhibición de EGFR-MAPK / ERK1 / 2 señalización, la actividad sobre Rb y proteínas E2F y la señalización de IGF-receptor. La actividad proapoptótica de la silibina en las células pre y / o cancerígenas y su actividad anti-angiogénica son otros hallazgos importantes para la aplicación en el tratamiento del cáncer.<sup>24</sup>

Un estudio sobre la administración de silibina-fitosoma realizado en 2007 en Colorado, el objetivo del ensayo fue determinar los efectos de altas dosis de silibina-fitosoma en pacientes con cáncer de próstata. Seis pacientes recibieron 13 g de silibina-fitosoma por día durante 20 días con seis participantes como sujetos de control. Se observó que dosis altas por vía oral de silibina-fitosoma alcanzaban concentraciones sanguíneas altas de manera transitoria, pero bajos niveles de silibina en el tejido de la próstata. La falta de penetración en el tejido puede ser explicado por la corta vida media de la silibina, la breve duración de la terapia en este estudio o por un proceso activo de eliminación de silibina de la próstata.<sup>25</sup>

En la actualidad, hay publicados 131 ensayos clínicos con referencia a *Silybum marianum* según la base de datos de Pubmed, de los cuales se encuentran en realización 29 ensayos clínicos. (Tomado de Clinicaltrials.gov).

## 5.10 Farmacocinética

Absorción: Tras la administración oral, la absorción es baja, alcanzando concentraciones máximas en plasma al cabo de 4 a 6 horas tanto en animales como en humanos.

Distribución: La silibina y otros componentes de la silimarina son rápidamente conjugados con sulfato y ácido glucurónico a su paso por el hígado, alcanzando el plasma y la bilis. El compuesto se concentra en la bilis, donde se pueden encontrar concentraciones equivalentes al 80% de la dosis total administrada. Estos hallazgos sugieren que una gran proporción de la silibina absorbida se elimina de la circulación sistémica en su primer paso por el hígado, el órgano diana.

Biotransformación y eliminación: La semivida de eliminación de la silimarina es de 6 a 8 horas. El fármaco se excreta principalmente por la bilis y, en mucho menor grado, por la orina.<sup>26</sup>

La biodisponibilidad puede ser aumentada por complejación con fosfatidilcolina (silipide).

El análisis farmacocinético indica que, en general, los flavonolignanos que componen la silimarina son absorbidos y eliminados rápidamente ya que tienen una semivida corta después de la administración oral de un extracto estandarizado de Legalon® 175 mg 3 veces al día durante 28 días.

	Silybin A	Silybin B	Isosilybin B
$T_{max}$ (h)	2.0 (0.5–3.0)	1.0 (0.5–3.0)	2.0 (0.5–3.0)
$C_{trough}$ (ng/ml)	5.9 ± 7.9	2.2 ± 2.5	0.9 ± 1.2
$C_{max}$ (ng/ml)	134.7 ± 72.0	42.1 ± 27.3	26.8 ± 19.9
$AUC_{0-24}$ (ng × h/ml)	375.6 ± 200.8	99.7 ± 61.8	66.8 ± 48.4

Tomado de. Zhu et al. 2013

Los valores de  $C_{max}$  libre (no conjugada) de la silibina A fueron aproximadamente dos a tres veces más altos que los observados para la silibina B. Estas observaciones, así como el mayor valor de AUC para la silibina A se producen por la glucuronidación estereoselectiva por la silibina B.<sup>27</sup>

Los valores de la mediana de  $T_{max}$  de los tres flavonolignanos fueron entre 1,0 y 1,5 horas tras la administración de una cápsula de 175mg/ tres veces al día durante 28 días.

## 5.11 Interacciones farmacocinéticas con otros fármacos

Se ha señalado a través de estudios en cultivos de hepatocitos humanos que la silimarina y su principal constituyente la silibina, interactúan de manera inhibitoria con el sistema enzimático citocromo P-450, reduciendo la actividad de algunos fármacos. En pequeña medida afecta la actividad de las enzimas CYP3A4 (metaboliza eritromicina), CYP2E1 (clorzoxazona), CYP2C19 (mefenitoína), CYP1A2 (cafeína), CYP2A6 (cumarinas). Un moderado efecto fue observado por su afinidad con el metabolismo del dextrometorfano (CYP2D6) y una clara inhibición para la oxidación de dinitronifedipina (CYP3A4) y para la hidroxilación de warfarina (CYP2C9).<sup>5</sup>



Sin embargo, en un estudio publicado en 2014 al determinar las concentraciones máximas y las áreas bajo las curvas de concentración-tiempo de los medicamentos sonda y la exposición al extracto de silimarina no produjo ninguna influencia significativa en las actividades de CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 o CYP3A4.<sup>30</sup>

## 5.12 Toxicología

La silimarina administrada por distintas vías a ratón, rata, conejo o perro, se ha mostrado atóxica en prueba aguda a altas dosis y ha resultado igualmente inocua y sin acciones secundarias en pruebas subcrónicas y crónicas en rata.

La administración oral a ratas de 20 g/Kg y a perros de 1 g/Kg no produjo ninguna señal de toxicidad, embriotoxicidad ni reacciones adversas.<sup>26</sup>

La DL50 para la silibina (valorada como hemisuccinato sódico) por vía intravenosa en ratas y ratones fue de 1,010 mg/Kg y 873 mg/Kg respectivamente.

Los estudios de toxicidad subcrónica en ratas revelan que no hay efectos adversos a las dosis orales de 1 g de silimarina/ kg/día durante 15 días.<sup>28</sup>

Los mismos resultados se obtienen en estudios de toxicidad crónica, en los cuales se administra silimarina vía oral (100 mg/kg/día) a ratas durante 16 ó 22 semanas.

La administración tópica en voluntarios sanos demostró muy buena tolerabilidad, con ausencia de sensibilización a la radiación UV.

## 5.13 Preparados comerciales y preparados farmacéuticos

El cardo mariano se puede encontrar en preparaciones en forma tinturas, infusiones, extracto seco, extracto líquido, en cápsulas y comprimidos recubiertos. En España, hay tres preparados comercializados que se describen a continuación:

**Silibum ortho®:** Cada comprimido recubierto contiene extracto seco de *Silybum marianum* (150,00 mg) con un contenido del 65% de silimarina. Está indicada en el tratamiento sintomático de los trastornos digestivos asociados a alteraciones funcionales hepáticas. La dosis usual es de 1 comprimido cada 8 horas.<sup>29</sup>

**Legalon®:** Cada cápsula contiene 196 mg de extracto de *Silybum marianum* equivalentes a 150 mg de silimarina calculada como silibina. Está indicado para el tratamiento de las lesiones de origen tóxico-metabólico, especialmente aquellas que se caracterizan por una intensa peroxidación, como las provocadas por una ingesta crónica de alcohol y de medicamentos hepato-tóxicos, esteatosis hepática, hepatitis alcohólica y cirrosis hepática. La dosis es de 1 cápsula (150 mg) tres veces al día.<sup>26</sup>

**Legalon SIL®:** Un vial para perfusión contiene 598,5 mg de producto liofilizado que incluye 528,5 mg de silibina-C-2',3-dihidrogenosuccinatodisódico, equivalente a 350 mg de silibina. Se utiliza para el tratamiento de la intoxicación por *Amanita phalloides*. La dosis recomendada es de 20 mg de silibina por kg de peso corporal y día, repartida en 4 perfusiones i.v. de 2 horas de duración cada una, y con 4 horas de intervalo entre las mismas, controlando el balance de líquidos. Las perfusiones con Legalon SIL® deberán iniciarse tan pronto como sea posible después de la intoxicación.<sup>28</sup>

Los mayores problemas de la silibina y de la silimarina para su dosificación y la aplicación terapéutica son su baja biodisponibilidad oral y que son compuestos insolubles en agua. Para intentar solucionar estos problemas se está llevando a cabo la utilización de la nanotecnología para desarrollar nuevas formas farmacéuticas para estos compuestos. Estas formas farmacéuticas permiten aumentar la biodisponibilidad de los compuestos y se suelen utilizar para los compuestos insolubles en agua. Según una revisión de la revista “Journal of Biomedical Nanotechnology” las estrategias de nanotecnología que se están utilizando para la silibina son nanosuspensiones de dicho compuesto que permiten aumentar la solubilidad, permeabilidad, y biodisponibilidad de la silibina formulada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas formulaciones son más inestables y que se permiten una menor dosificación del compuesto dentro del sistema de la nanosuspensión. También se están estudiando sistemas de dosificación de nanopartículas lípidas y de micelas, entre otras<sup>31</sup>. Todas estas nuevas formas farmacéuticas se están desarrollando con el fin de mejorar la aplicación terapéutica de los flavonolignanos del cardo mariano en las patologías hepáticas y cancerígenas.

## 6. DISCUSIÓN

Después de la revisión de *Silybum marianum* en la que hemos ido del pasado al futuro, ya que ha sido una planta utilizada desde la antigüedad citada por Dioscórides como galactogogo y que esta actividad ha sido estudiada por la EFSA en 2010.

Como ya sabemos, esta planta contiene flavonolignanos como principios activos mayoritarios y ya se ha conseguido realizar una síntesis total del compuesto mayoritario que es la silibina, esto es de gran importancia ya que de esta manera no dependemos del cultivo de la planta para la extracción de sus principios activos. También se han ido desarrollando una serie de derivados de la silibina debido a la mejora de la solubilidad en agua y la baja biodisponibilidad oral.

Se ha observado que la silibina tiene múltiples acciones farmacológicas sobre el hígado, las cuales se han ido estudiando durante muchos años a través en ensayos *in vitro* e *in vivo* y en ensayos clínicos con el fin de poder ser utilizadas para el tratamiento de las enfermedades hepáticas. Además, en un futuro puede que esta planta vaya a llegar a tener una gran importancia en la terapia contra el cáncer y como antibacteriano biofilm. Estos hechos ya se están estudiando pero todavía necesitan más estudios que los confirmen.

Además según los estudios de toxicidad se considera al cardo mariano como una planta segura y no tóxica. Ya existen en nuestro país tres formas farmacéuticas comercializadas, aunque por su baja biodisponibilidad oral se están intentando desarrollar unas nuevas formas farmacéuticas basadas en la nanotecnología como son las nanosuspensiones, nanopartículas.

## 7. CONCLUSIONES

Tras esta revisión sobre el cardo mariano, hemos observado que sus principios activos mayoritarios tienen amplias actividades farmacológicas que se están estudiando en diferentes ensayos. Tras los buenos resultados obtenidos, los flavonolignanos de dicha planta se podrían llegar a utilizar para el tratamiento de alteraciones hepáticas y así cubrir el vacío terapéutico para estas patologías. Además, se está estudiando los posibles efectos de esta planta para la utilización en la terapia contra el cáncer. Estos compuestos no presentan toxicidad y se han considerado como sustancias seguras.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ortega L. Producción de silimarina en cultivos celulares de Cardo mariano (*Silybum marianum*): efecto de distintos elicitores. Trabajo fin de Máster. Universidad de Salamanca, Junio 2012.
2. List of German Commission E Monographs (Phytotherapy) [Internet] [Publicado 13 mar 1986; citado 6 Jun 2015] Disponible en: <http://buecher.heilpflanzen-welt.de/BGA-Commission-E-Monographs/>
3. European Medicines Agency. [Internet] Call for submission of scientific data on *Silybum marianum* (L.) Gaertner, fructus. [Publicado 22 May 2010; citado 6 Jun 2015] Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal\\_med\\_000038.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000038.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d)
4. Biedermann, D, Vavř'íkov' E., Cvak L., and Kren'a V. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.*, 2014, 31, 1077–1232.
5. WHO. WHO monographs on selected medicinal plants Volume 2. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2002. Disponible en : [www.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/](http://www.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/)
6. Keshavarz Afshar R., Reza Chaichi M., Ansari Jovini M., Jahanzad E., Hashemi M. Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. *Planta*, Feb 2015
7. Real Farmacopea Española 3ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo (2005)
8. Tan C, Xu X., Shang Y., Fu X., Xia, G and Yang H. A novel approach for the efficient extraction of silybin from milk thistle fruits. *Pharmacogn Mag.* 2014 Oct-Dec; 10(40): 536–540.
9. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to silymarin BIO-C® and increase in production of breast milk after delivery pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2010;8(9):1774
10. Vargas N, Madrigal E, Morales Á, Esquivel J, Esquivel C, García M, Gayosso JA, Morales JA. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 6(3): 144-149
11. Polyak S ,Oberlies N, Pécheur E, Dahari H, Ferenci P, and Pawlotsky J. Silymarin for hepatitis C virus infection. *Antivir Ther.* 2013 ; 18(2): 141–147
12. Frascini F., Demartini G., Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest* 2002 22(1):51-65.
13. Abenavoli L., Capasso R., Milic N., Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010, 24 (10) 1423-32.

14. Borah A, Paul R, Choudhury S, Choudhury A, Bhuyan B, Das Talukdar A, Dutta Choudhury M, Mohanakumar KP. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS Neurosci Ther.*2013;19(11):847-53
15. John Power. *Silybum marianum* Monograph. *JATMS* March 2014, 45
16. Rašković A, Stilinović N., Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S. and Mikov M. The Protective Effects of Silymarin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. *Molecules* 2011, 16, 8601-8613
17. Rakelly de Oliveira D., Relison Tintino S, Bezerra Moraes Braga F., Boligon A, Linde Athayde M, et al. In Vitro Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin. *BioMed Research International* Volume 2015, 7.
18. Rambaldi A, Jacobs BP, Iaquinto G, Gluud C. Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C virus liver diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007
19. Parés A., Planas R., Torres M., Caballería J., Viver J., Acero D. et al. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *Journal of hepatology* 1998, 28, 4, 615–621
20. Hackett S, Twedt C, Gustafson L. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med.* 2013 ,27(1),10-6
21. Tamayo C. and Diamond S. Review of Clinical Trials Evaluating Safety and Efficacy of Milk Thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) *Integr Cancer Ther* 2007; 6; 146.
22. Szilárd S1, Szentgyörgyi D, Demeter I. Protective effect of Legalon in workers exposed to organic solvents. *Acta Med Hung.* 1988;45(2):249-56
23. Nordt S. P. and Manoguerra A. 5-Year analysis of mushroom exposures in California. *West J Med.* 2000; 173(5): 314–317
24. Gazák R1, Walterová D, Kren V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem.* 2007;14(3):315-38.
25. Flaig TW, Gustafson DL, Su LJ, Zirrolli JA, Crighton F, Harrison GS, Pierson AS, Agarwal R, Glodé LM. A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. *Invest New Drugs.* 2007 ,25(2),139-46
26. Agencia Española del Medicamento (AEMPS) [Internet]. Ficha técnica Legalon®. Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/52190/FT\\_52190.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/52190/FT_52190.pdf)
27. Zhu H, Bryan J, Kenneth B. Chavin D., Hilary J. Bernstein, Kennerly S. Patrick, and Markowitz J. An Assessment of Pharmacokinetics and Antioxidant Activity of Free Silymarin Flavonolignans in Healthy Volunteers: A Dose Escalation Study. *Drug Metab Dispos* 2013 41:1679–1685.
28. Agencia Española del Medicamento (AEMPS).[Internet] Ficha técnica Legalon SIL ® Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/59430/FT\\_59430.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/59430/FT_59430.pdf)
29. Agencia Española del Medicamento (AEMPS). [Internet]Ficha técnica Silybum ortho® Disponible en. [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/65453/FT\\_65453.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/65453/FT_65453.pdf)
30. Kawaguchi-Suzuki M, Frye RF, Zhu HJ, Brinda BJ, Chavin KD, Bernstein HJ, Markowitz JS. The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metab Dispos.* 2014 , 42(10),1611-6
31. Wang Y, Zhang L., Wang Q. and Zhang B. Recent Advances in the Nanotechnology-based Drug Delivery of Silibin.J *Biomed Nanotechnol* 2014, 10, 543-558.