

# Imunomodulação de Fagócitos do Sangue Humano pelo Extrato de *Strychnos Pseudoquina* ST. HILL Adsorvido em Microesferas de Polietilenoglicol

Mayra Aparecida Côrtes, Eduardo Luzia França, Ana Paula Barcelos Reinaque, Edson Fredulin Scherer, Adenilda Cristina Honorio-França

*Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso, UFMT*

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi promover a adsorção da *Strychnos pseudoquina* ST. HILL (Quina do Cerrado) em microesferas de PEG e avaliar seu efeito imunomodulador sobre a atividade funcional de fagócitos de sangue humano. Foram coletadas 120 amostras de sangue humano para obtenção dos fagócitos. O extrato aquoso da planta foi obtido por maceração seguida de destilação. As microesferas de polietilenoglicol foram analisadas por microscopia de fluorescência, por citometria de fluxo e por espectroscopia no infravermelho e a atividade funcional dos fagócitos foi verificada através da liberação de superóxido, da fagocitose e da atividade microbicida. As análises de microscopia de fluorescência e de citometria de fluxo revelaram que as microesferas de PEG apresentaram um tamanho aproximado de 5,8 µm e que o extrato da “Quina do Cerrado” e suas frações foram capazes de adsorverem às microesferas de PEG. A adsorção da quina e de suas frações às microesferas de PEG aumentou a atividade funcional dos fagócitos. Estes dados permitem concluir que a adsorção do extrato de *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. em microesferas de PEG pode ser um importante neomaterial funcional para futuras aplicações clínicas em doenças inflamatórias e crônicas degenerativas.

**Palavras-chave:** *Fagócitos, polietilenoglicol, strychnos pseudoquina ST. HILL., microesferas.*

## Immunomodulation of Human Blood Phagocytes by *Strychnos Pseudoquina* ST. HILL Adsorbed to Polyethylene Glycol (PEG)

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the adsorption of *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. (“Quina do Cerrado”) onto PEG microspheres and to verify the immunomodulatory effect on blood phagocytes. 120 blood samples from humans were used to obtain the phagocytes. Preparation of plant extract of *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. was carried out by maceration followed by distillation. The PEG microspheres were analyzed by fluorescence microscopy, flow cytometry and infrared spectrum, while the functional activity of phagocytes was measured by the release of superoxide, phagocytosis and microbicidal activity of blood phagocytes. The analysis of fluorescence microscopy and flow cytometry revealed that the PEG microsphere had approximately 5.8 µm in size and that “Quina do Cerrado” and its fractions were able to adsorb onto PEG microspheres. The adsorption of the plant and its fractions to the PEG microspheres increased the functional activity of phagocytes. These data show that the adsorption of the extract of *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. on PEG microspheres can be an important functional new material for future clinical applications in inflammatory and chronic degenerative diseases.

**Keywords:** *Phagocytes, polyethylene glycol, strychnos pseudoquina ST. HILL., microspheres.*

## Introdução

Polímeros são moléculas naturais ou sintéticas caracterizadas pela repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos ligados uns aos outros em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades que não variam acentuadamente com a adição ou remoção de uma ou mais unidades constitucionais<sup>[1]</sup>. São versáteis e podem ser aplicadas em diversas áreas, entre estas, na área farmacêutica que são empregados como excipientes em preparações para medicamentos<sup>[2]</sup>.

A utilização de polímeros para o desenvolvimento de microesferas (sistemas matriciais) tem-se mostrado como uma importante estratégia na busca pela otimização da liberação de fármaco. Existe uma grande variedade de polímeros, dentre eles o polietilenoglicol

(PEG), que possui capacidade de formação de estruturas mais porosas, tornando-se útil na melhoria da velocidade de liberação do fármaco, além de apresentar ainda a capacidade de adsorção a compostos orgânicos que visam a melhoria das funções biológicas<sup>[3,4]</sup>.

O Polietilenoglicol (PEG) é um homopolímero sintético, linear que apresenta como fórmula molecular  $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ , onde  $n$  é o número médio de grupos de óxido de etileno presentes na molécula, chamado grau de polimerização<sup>[5]</sup>.

Por outro lado, as plantas sempre foram utilizadas pela população para fins medicinais e vários trabalhos científicos vem sendo realizados na tentativa de obter substâncias com propriedades biológicas ativas<sup>[6-8]</sup>. Os avanços científicos em relação às propriedades

biológicas ativas presentes em plantas medicinais vem ocorrendo por meio da incorporação em sistemas carreadores de liberação controlada de fármacos, que podem oferecer inúmeras vantagens em comparação às técnicas farmacêuticas convencionais melhorando assim a eficácia terapêutica, reduzindo a toxicidade e aumentando a biodisponibilidade da fração ativa na área necessária<sup>[8-10]</sup>.

Diversas plantas empregadas na medicina tradicional produzem substâncias naturais que apresentam atividades imunomoduladoras em células do sistema imunológico e ação antimicrobiana<sup>[11]</sup>. Várias pesquisas abordam o mecanismo de ação antimicrobiana dos fagócitos. Na fagocitose ocorre ativação do metabolismo oxidativo em decorrência da estimulação celular, levando a geração de metabólitos ativos do oxigênio. Acredita-se que a liberação de radicais livres esteja associada ao processo de fagocitose e a atividade microbicida destinada a eliminar patógenos<sup>[12,13]</sup>.

A literatura científica relata eliminação de bactérias por fagócitos mononucleares, sendo sua atividade microbicida estimulada na presença de agentes imunomoduladores<sup>[14-17]</sup>. Substâncias de origem natural vêm sendo estudadas através de atividades terapêuticas de extratos de plantas e utilizadas com propósito de atuar como agentes imunomoduladores, permitindo assim, modificar a função do sistema imunológico<sup>[18,19]</sup>. Plantas que podem estimular o sistema imunológico são vistas pela sociedade científica como alternativas ao tratamento de diferentes infecções<sup>[11,12]</sup>.

O cerrado brasileiro é reconhecido por apresentar uma grande biodiversidade. O gênero *Strychnos* é constituído por 150 espécies presentes no mundo inteiro. Apenas a *S. pseudoquina* (“Quina do Cerrado”), uma espécie nativa da América do Sul, pertencente à família Loganiaceae. Trata-se de uma árvore de médio porte onde seu tamanho varia entre 3 a 6 metros de altura<sup>[20,21]</sup>.

O gênero *Strychnos* tem história na medicina popular, onde a espécie é usada em distúrbios gástricos, no tratamento de malária<sup>[22]</sup> e no diabetes devido a efeitos hipoglicemiantes<sup>[21]</sup>. Apesar do grande emprego popular, na literatura não foram encontrados trabalhos relativos aos efeitos imunomoduladores da “Quina do Cerrado”.

Assim, este trabalho teve como objetivo verificar in vitro a adsorção do extrato de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* em microesferas de polietilenoglicol (PEG) e avaliar a capacidade imunomoduladora sobre os fagócitos do sangue periférico humano.

## Material e Métodos

**Preparação do extrato puro de *Strychnos pseudoquina ST. HIL*.** Para obtenção do material vegetal, foi coletada a entrecasca da Quina do Cerrado localizada no Instituto de Ciências Biológicas e Ciências da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso - Pontal do Araguaia - MT, Brasil, Lat. 15° 55' 08" S Long. 52° 16' 44" W, com altitude de 365 m. Após a coleta da entrecasca, utilizou-se um ralador em inox, perfazendo um total de 500 gramas de pó vegetal seco. Para a preparação do extrato etanólico sobre o material vegetal foi vertido em 3600 mL de etanol P.A. e deixados sob maceração por quinze dias

em temperatura ambiente sendo misturado uma vez por dia. Após este período foram então filtradas utilizando um funil analítico e algodão vegetal totalizando 1450 mL de extração etanólica. A seguir foi rotaevaporado (Rotaevaporador Fisatom 801) 500 mL de extração etanólica totalizando 13,75 g de extrato seco (Estufa Biopar 527).

**Fracionamento e obtenção dos extratos a partir da *Strychnos pseudoquina ST. HILL*.** Após obtenção do extrato seco, este foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol. Feita a separação dos solventes por polaridade crescente, as frações foram colocadas em estufa (Biopar 527) a 50 °C para secagem. Em seguida, foram pesadas as frações secas de hexano (200 mg), diclorometano (300mg), acetato de etila (1 g.) e 1- butanol (0,95 g) (Balança Bel – engineering). As frações secas foram diluídas novamente em água destilada e as concentrações foram ajustadas para 100 ng/mL. Foi utilizado polissorbato 80 (Tween® 80) a 10% (volume/volume) como agente tensoativo, para a dissolução das frações secas de Hexano, Diclorometano e 1-Butanol.

Seleção do polímero: O polímero utilizado foi o polietilenoglicol (PEG – Sigma, 6000).

**Preparação de microesferas de PEG:** Para a preparação das microesferas de polietilenoglicol a 20%, seguiu-se o protocolo de Scott<sup>[3]</sup> modificado. Foram pesados 20 gramas de PEG e ressuspendidos em 100 mL de solução tampão fosfato (PBS). Uma solução de sulfato de sódio a 2% foi preparada em PBS. As soluções foram misturadas volume a volume. A solução foi incubada a 37 °C por 45 minutos e realizou-se uma diluição 3:1 PBS, sendo em seguida centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos. Para preparação do PEG de baixa densidade as soluções de PEG a 20% com as soluções de sulfato de sódio a 2% foram incubadas a temperatura de 95 °C por 3 minutos. Para a preparação de PEG de alta densidade as soluções de PEG a 20% com as soluções de sulfato de sódio a 2% foram incubadas a temperatura de 95 °C por 10 minutos. Em seguida as soluções foram combinadas (microesfera de PEG e extrato da planta), volume a volume, e incubadas a 37 °C por 30 minutos<sup>[23]</sup>. Subsequentemente, as microesferas de PEG foram marcadas com solução fluorescente Dylight-488 diluída em dimetilformamida (10 µg mL<sup>-1</sup> – Pierce), incubadas por 18 horas a temperatura ambiente na relação de 100:1 molar de PEG:Dylight e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse).

**Caracterização das Microesferas de PEG por Citometria de Fluxo:** Foi realizada a marcação com o fluorocromo ficoeritrina (PE - Sigma) para avaliar a capacidade de ligação da microesfera PEG (de alta e baixa densidade) a marcadores fluorescentes. Também utilizou-se como padrão a microesfera de polimetilmetacrilato (CaliBRITE BD). As microesferas de PEG foram incubadas com 5 µL de PE (0.1 mg/mL) na presença ou não de Quina do Cerrado por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, as microesferas de PEG foram lavadas por duas vezes em PBS contendo BSA (5mg/mL; 500 µg, 10 minutos, 4 °C). Em todos os experimentos

as microesferas PEG foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados através do FACS Calibur (BD San Jose EUA). O tamanho da microesfera de PEG foi comparado ao tamanho da microesfera BD (6µm -CaliBRITE 3 Beads - BD Cat. No 340486 USA). Os experimentos foram repetidos por cinco vezes, e a relação da intensidade de fluorescência e o tamanho da microesfera de PEG foram expressos através da média geométrica de intensidade de fluorescência e o tamanho calculado de acordo com média geométrica de Forward Scatter (FSC - parâmetro que avalia o tamanho da partícula).

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

As microesferas de PEG com ou sem *Strychnos pseudoquina ST. HILL* adsorvido na concentração de 20% foram analisadas usando a técnica de transmitância. A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para caracterizar a microesfera de PEG. Os espectros foram obtidos utilizando o equipamento Spectrum 100 FTIR, Perkin Elmer, na faixa de número de onda compreendida entre 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram normalizados e as principais bandas de vibração foram associadas com grupos químicos.

*Obtenção de amostras de sangue periférico humano, separação de células sanguíneas:* Foram coletadas amostras de sangue periférico de doadores clinicamente saudáveis, de ambos os sexos e idades variadas. Todos os doadores receberam orientações sobre o trabalho científico e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram coletadas 120 amostras de sangue periférico perfazendo, cada amostra, aproximadamente 15 a 20 mL em tubos heparinizados, na proporção de 25 unidades de anticoagulante por mL de sangue, para obtenção de leucócitos. A seguir foi realizada a separação das populações celulares por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia), sendo as células centrifugadas a 1500 rpm durante 40 min. O anel enriquecido de fagócitos mononucleares foi retirado separadamente e lavado duas vezes em meio de cultura 199 (Gibco). As células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para  $2,0 \times 10^6$  células/mL.

*Linhagem e culturas de E. coli enteropatogênica (EPEC):* A *Escherichia coli* enteropatogênica utilizada foi a EPEC 0111:H<sup>-</sup>, LA<sup>+</sup>, eae<sup>+</sup>,EAF<sup>+</sup>,bfp<sup>+</sup>. A linhagem foi cultivada em Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) por 18 horas a 37 °C. As bactérias foram lavadas duas vezes em solução tampão fosfato (PBS) e ajustado para uma concentração de  $1,0 \times 10^7$  bactérias / mL, medido em espectrofotômetro (Femto) em comprimento de onda de 540 nm. Esta concentração bacteriana foi previamente determinada pela contagem da unidade formadora de colônia em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Detroit)<sup>[15]</sup>.

*Dosagem de ânion superóxido:* O metabolismo oxidativo foi analisado através da liberação de ânion superóxido, pelos fagócitos do sangue, em presença de nanofrações obtidas por polaridade crescente a partir do extrato puro de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* adsorvidas ao Polietilenoglicol, incubados ou não

com EPEC. A liberação do ânion superóxido foi determinada utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C (concentração de 2 mg/mL). Um controle contendo somente células também foi realizado paralelamente para verificar a liberação espontânea do ânion superóxido pelas células. As suspensões de células previamente ajustadas ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas em microplacas de 96 poços, utilizando 150 µL de células ressuspendidas em citocromo. As células foram estimuladas com PEG de alta e baixa densidade e com o extrato de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* (concentração de 100 ng/mL) durante 1 hora a 37 °C, sob agitação para favorecer a fagocitose. Para a dosagem da liberação do ânion superóxido na presença da bactéria EPEC, volumes iguais foram suspensos (bactéria e célula) seguindo mesmo protocolo. A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro de 640 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação: Concentração  $\text{O}_2^-$  (nmol) =  $\text{DO} \times 100 / 6,3$

*Viabilidade, fagocitose e atividade microbicida:* Os testes para verificar a viabilidade e da atividade microbicida dos fagócitos humanos foram avaliados pelo método de alaranjado de acridina (Sigma). Volumes iguais de suspensão de bactérias e de células (fagócitos mononucleares) foram misturados em tubos plásticos. O volume final, da mistura fagocitária, foi dependente do rendimento celular das amostras, não sendo inferior a 0.5 mL. A suspensão de EPEC e células foi submetida à incubação prévia por 30 minutos, sob agitação a 37 °C e após incubadas às nanofrações de Quina e às frações obtidas por polaridade crescente a partir do extrato puro de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* (hexano, acetato de etila, 1-butanol- concentração final de 100 ng/mL). Após esse período a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 1600 rpm. O “pellet” foi corado com 200 µL de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg/mL) por 1 minuto e ressuspendida em meio de cultura 199 gelado, centrifugado e lavado novamente. A seguir foram montadas lâminas e contadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x e 1000x. O índice de viabilidade foi calculado pela contagem de 100 células observando o tipo de coloração emitida. As células viáveis correspondem às coradas na cor verde (células vivas) e as não-viáveis na cor laranja (células mortas). O índice de fagocitose foi calculado pela contagem do número de células que ingeriram pelo menos três bactérias em um total de 100 células. Para determinar o índice bactericida, seguiu-se o mesmo protocolo onde as células foram coradas com acridina orange. Foram contadas para a amostra, 100 células onde foi observada a presença de bactérias vivas ou mortas.

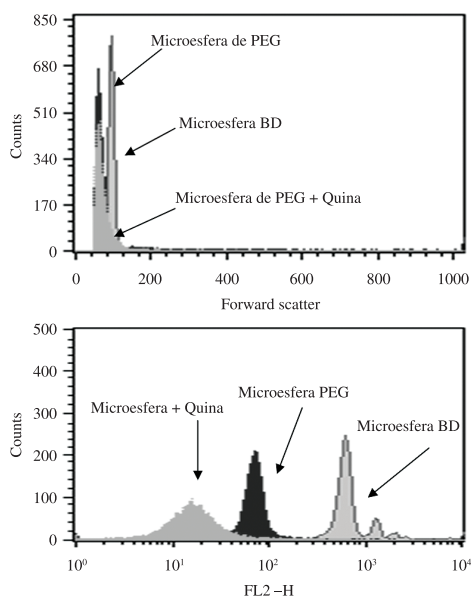
*Análise estatística:* As análises estatísticas da liberação do ânion superóxido, da atividade microbicida e viabilidade celular foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) calculando a estatística F. As estatísticas foram consideradas significativas quando o “p valor” foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Neste estudo, utilizando a microscopia de fluorescência e citometria de fluxo observou-se que foram produzidas microesferas PEG que apresentam capacidade

de ligar-se a compostos orgânicos. A literatura tem relatado o uso de citometria de fluxo como um método alternativo para caracterização, análise e visualização de partículas<sup>[18,24]</sup>. Aqui mostrou-se por citometria de fluxo que as microesferas de PEG adsorvida ao extrato de Quina, independente da densidade, apresentaram um tamanho médio de aproximadamente 5,8  $\mu\text{m}$  (Figura 1). A adsorção do extrato de Quina do Cerrado não alterou seu tamanho porém diminuiu a capacidade de ligar-se a substâncias fluorescentes. Complementando estes dados a microscopia de fluorescência revelou que as microesferas de polietilenoglicol (PEG) apresentaram-se como estruturas esféricas, de tamanhos regulares e estáveis (Figura 2a), capazes de adsorver o extrato da *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. (Figura 2b).

Para caracterizar as mudanças químicas e estruturais das microesferas de PEG utilizou-se a técnica de Espectroscopia no Infravermelho. As Figuras 3a, b mostram os espectros das microesferas de PEG. Observa-se uma banda larga entre 3550-2200  $\text{cm}^{-1}$  e vários picos entre 1800 a 900  $\text{cm}^{-1}$ . Quando o extrato da *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. foi adsorvido a microesfera de PEG observa-se uma banda entre 3550  $\text{cm}^{-1}$  e somente dois picos entre 1800 a 900  $\text{cm}^{-1}$

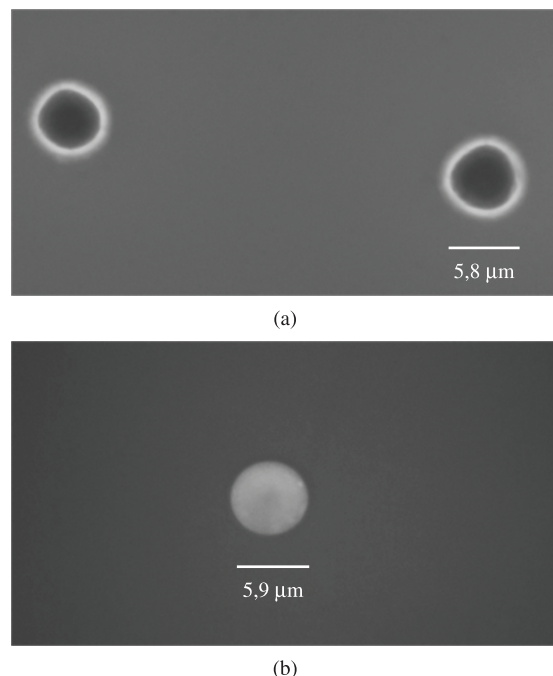


Microesfera	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	Intensidade de fluorescência (%; média $\pm$ sd)
BD	6 $\pm$ 0,21	88,5 $\pm$ 8,1
PEG	5,8 $\pm$ 0,30	69,6 $\pm$ 6,7
PEG+QUINA	5,9 $\pm$ 0,35	43,9 $\pm$ 7,5

**Figura 1.** Microesfera de PEG marcada com o fluorocromo ficoeritrina (PE) adsorvida ou não a *Strychnos pseudoquina* ST. HILL., conforme descrito em materiais e métodos. Microesfera de Polimetilmetacrilato marcada com PE (Microesfera da BD - Becton Dickinson, USA) foi usada como padrão. A análise de imunofluorescência e o tamanho da microesfera foram avaliados por Citometria de Fluxo (FACSscalibur, Becton Dickinson, USA).

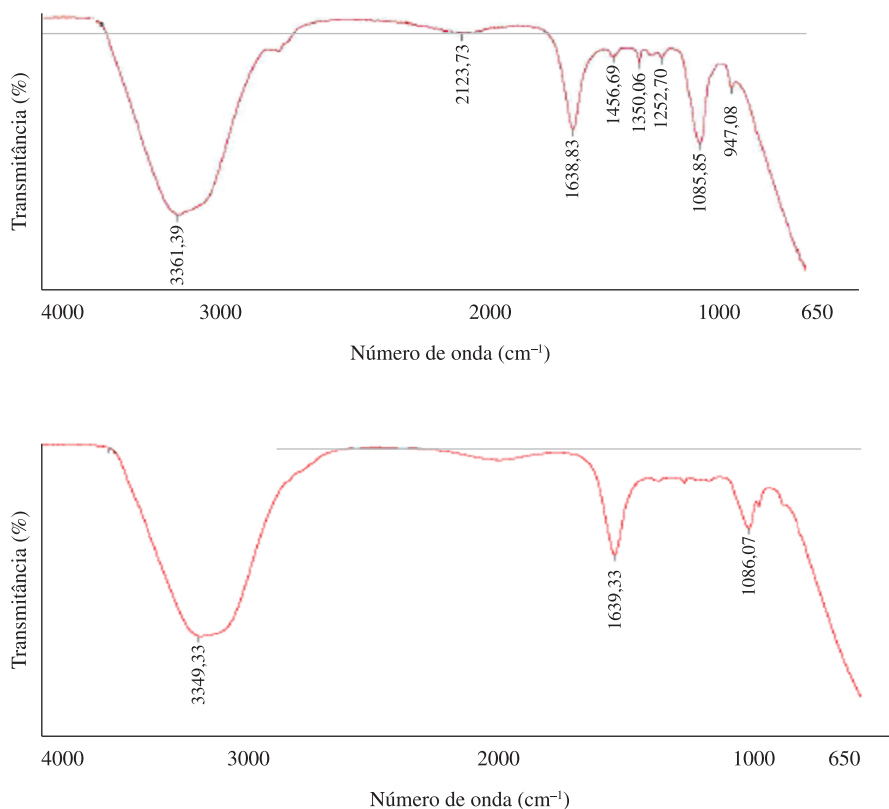
(Figura 3). A literatura relata que o PEG apresenta uma banda larga entre 3550  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionada com os grupos hidroxilas terminais e as bandas de 3010 a 2955  $\text{cm}^{-1}$  são de grupos de dueto C-H e CH<sub>2</sub>, e 2885  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento C-H do grupo CH<sub>2</sub>. A banda de 1762,6  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada ao estiramento do grupo C=O. A absorção de 1186-1089,6  $\text{cm}^{-1}$  é devido ao estiramento do grupo C-O<sup>[25]</sup>. Neste estudo observam-se alterações de algumas bandas identificadas nos espectros de 1500 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  das microesferas de PEG quando adsorvida ao extrato da “Quina do Cerrado”, sugerindo que houve interação entre o polímero e o *Strychnos pseudoquina*. Estas alterações observadas nestes espectros podem estar ligadas à composição aquosa do extrato. A literatura relata que as formas de alterações de bandas podem estar associadas ao peso molecular do polímero, ou ao teor de água presente em soluções<sup>[26]</sup>. Trabalho analisando a adsorção de eluentes a base de água e metanol para PEG verificou alterações no intervalo espectral de 1300 a 1400  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[27]</sup>.

O polietilenoglicol em formulações de microesferas permite o controle e o desenvolvimento de poros através do peso molecular e da concentração o que pode modular a velocidade com que o fármaco é liberado a partir da matriz polimérica<sup>[4]</sup>. Por outro lado, a efetividade de plantas medicinais tem ampliado a possibilidade para obtenção de novas drogas<sup>[28]</sup> e estudos relatam a utilização de um grande número de plantas<sup>[29]</sup>. Várias plantas medicinais têm mostrado capacidade de induzir a ativação do sistema imune e proteção para uma variedade de doenças<sup>[2,30]</sup>.



**Figura 2.** Imagem de Microscopia de Fluorescência da Microesfera de PEG corada com Dylight-488 (100 $\times$  - painel - A). A microesfera foi incubada com *Strychnos pseudoquina* ST. HILL. (100 $\times$  - painel - B) sob agitação por 30 min a 37  $^{\circ}\text{C}$  e corada com Dylight-488. Os experimentos foram repetidos por cinco vezes e os resultados foram comparados.





**Figura 3.** Espectro na região do infravermelho para a microesfera de PEG sem (A) e com (B) o extrato de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* adsorvido.

Neste estudo verificou-se a adsorção de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* a microesferas de polietilenoglicol com diferentes densidades modulou a atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano.

Os resultados da viabilidade celular de fagócitos mononucleares (MN) do sangue periférico humano na presença dos extratos aquoso da *S. pseudoquina* e dos extrato biodirecionados associados ou não ao polietilenoglicol estão apresentados na Tabela 1. O extrato bruto da Quina do Cerrado adsorvidos ao PEG não alterou a viabilidade dos fagócitos. Também as frações originárias do Acetato de etila e do 1 – butanol apresentaram menores índices de toxicidade às células sanguíneas evidenciado pelos altos índices de viabilidade. Por outro lado, a fração obtida através do solvente Diclorometano apresentou-se altos índices de toxicidade celular, sendo considerado como uma fração incompatível biologicamente.

Os fagócitos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Eles produzem superóxido pela ação da NADPH oxidase durante a fagocitose, sendo este metabólito ativo derivado do oxigênio importante para eliminar bactérias<sup>[31]</sup> e crucial para o sucesso das respostas imunes e reações inflamatórias<sup>[32]</sup>.

No estresse oxidativo, as células são capazes de gerar grandes quantidades do radical superóxido<sup>[33,34]</sup>.

**Tabela 1.** Índice (%) da viabilidade de fagócitos mononucleares do sangue periférico humano (MN) na presença do extrato aquoso da *S. pseudoquina* e dos extratos biodirecionados associados ou não a microesfera de PEG.

Frações	Viabilidade de Fagócitos (MN) %
<i>S. pseudoquina</i>	83.2 ± 2.5
<i>S. pseudoquina</i> + PEG A	81.6 ± 1.5
<i>S. pseudoquina</i> + PEG B	87.0 ± 2.6
PEG A	80.2 ± 1.7
PEG B	87.0 ± 2.6
Hexano	80.0 ± 1.1
Hexano + PEG A	80.0 ± 0.7
Hexano + PEG B	80.8 ± 1.3
Diclorometano	28.2 ± 2.1
Diclorometano + PEG A	28.0 ± 2.1
Diclorometano + PEG B	25.2 ± 1.9
Acetato de Etila	93.2 ± 1.7
Acetato de Etila + PEG A	90.8 ± 2.8
Acetato de Etila + PEG B	93.6 ± 2.5
1-Butanol	92.2 ± 1.4
1-Butanol + PEG A	91.0 ± 1.4
1-Butanol + PEG B	91.6 ± 2.2

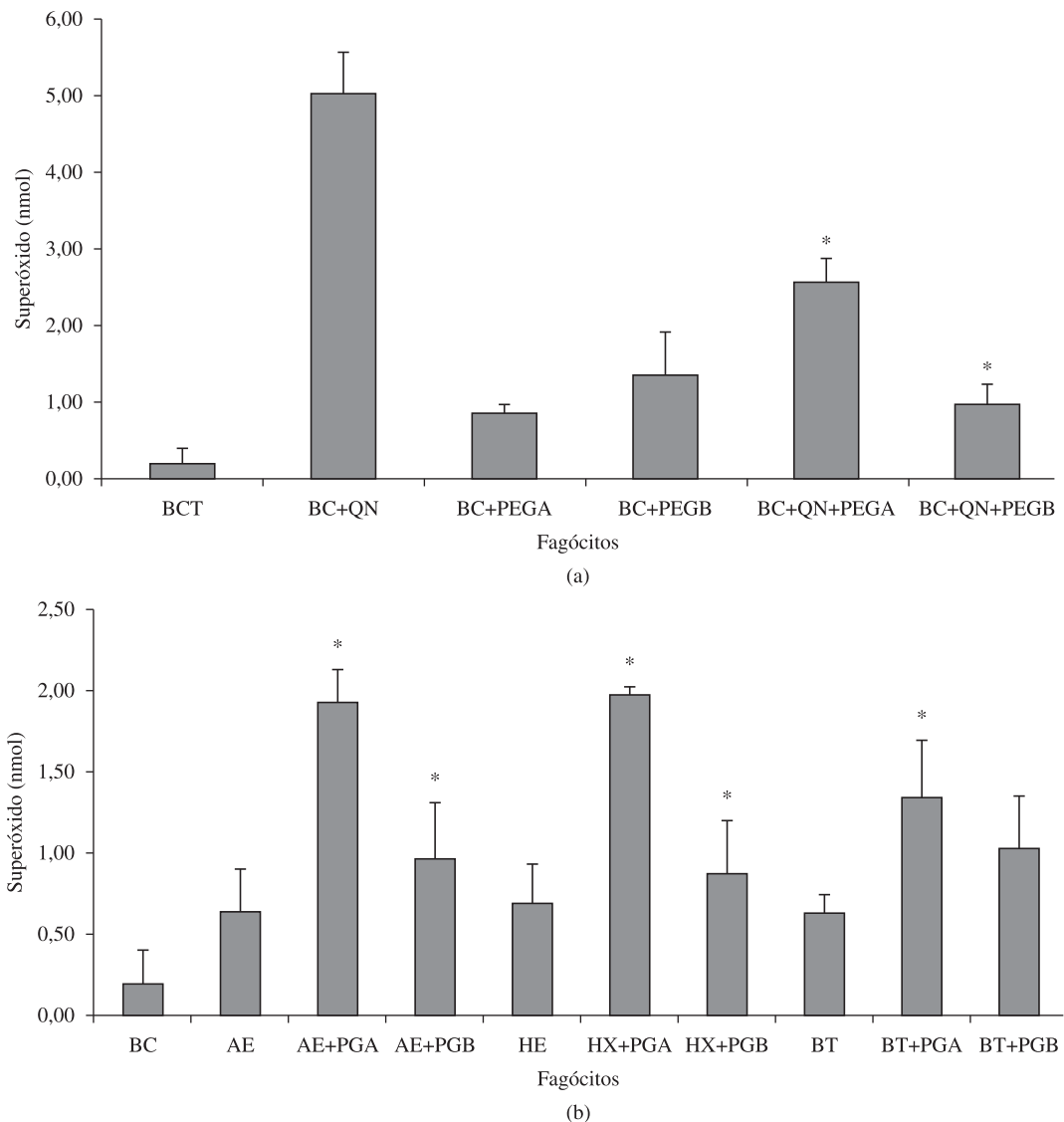
A geração de radicais livres tem sido reportada como importante mecanismo de defesa do organismo durante os processos infecciosos, principalmente em infecções intestinais<sup>[15-17]</sup>.

Neste trabalho, a liberação do ânion superóxido foi maior quando os fagócitos foram incubados com extrato da planta na presença da bactéria. O extrato da *S. Pseudoquina* ST. HILL adsorvido a microesfera de PEG também aumentou a liberação do ânion superóxido pelos fagócitos do sangue (Figura 4). As frações originárias do Acetato de Etila, 1-Butanol e Hexano adsorvidas ao PEG também estimularam a produção do ânion superóxido por estas células.

O aumento da liberação de superóxido refletiu na atividade fagocítica e microbicida. A atividade fagocítica de células mononucleares presentes no sangue humano

para EPEC na presença do extrato e de nanofrações de *S. Pseudoquina* pode ser observado na Tabela 2. Houve um aumento no índice de fagocitose pelas células do sangue incubadas aos extratos da planta quando comparados com os resultados apresentados pelas células incubadas somente com as bactérias. A atividade microbicida foi significativa quando as células foram incubadas às frações de acetato de etila associada ao PEG B (polietilenoglicol de baixa densidade – Tabela 2). Este aumento da atividade microbicida associado ao PEG de baixa densidade pode ser devido a capacidade de carreamento do PEG. A literatura tem mostrado que a utilização de PEG de baixa densidade em outros sistemas aumenta a eficiência do polímero para 100% de carreamento<sup>[35]</sup>.

A fagocitose e a atividade microbicida são caracterizadas como um mecanismo importante de



**Figura 4.** Liberação de ânion superóxido pelos fagócitos de sangue periférico humano na presença da EPEC (BC) estimulados com microesferas PEG-A (polietilenoglicol de alta densidade) e PEG-B (polietilenoglicol de baixa densidade) adsorvidas ao extrato de *S. Pseudoquina* (QN - Figura A) e a nanofrações de *S. Pseudoquina* (Figura B - AE: acetato de etila, HE; Hexano, BT: 1-butanol) \* Os resultados representam a média ( $\pm$  DP) de cinco experimentos com células de indivíduos diferentes. (ANOVA  $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Índices de Fagocitose (%) e da atividade microbicida (%) dos fagócitos mononucleares do sangue humano para EPEC.

Grupos	Fagocitose (%)	Atividade microbicida (%)
Células	55,4 ± 3,5	75,2 ± 5,2
<i>S. pseudoquina</i> + PEG A	71,4 ± 2,5*	35,8 ± 3,2
<i>S. pseudoquina</i> + PEG B	88,0 ± 1,2*	79,9 ± 3,4
PEG A	84,4 ± 2,1*	57,2 ± 2,2
PEG B	72,0 ± 5,2*	73,0 ± 5,6
Hexano	84,0 ± 2,4*	71,4 ± 3,2
Acetato de Etila + PEG A	76,4 ± 3,6*	71,5 ± 2,7
Acetato de Etila + PEG B	70,0 ± 1,6*	82,8 ± 2,5
1-Butanol + PEG A	82,8 ± 1,8*	81,8 ± 4,7
1-Butanol + PEG B	86,4 ± 2,1*	78,7 ± 3,5

\*Os resultados representam as diferenças significativas entre os grupos tratados ou não com PEG A (polietilenoglicol de alta densidade) e PEG B (polietilenoglicol de baixa densidade) (ANOVA -  $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e o desvio padrão de 5 experimentos com células de indivíduos diferentes.

defesa do organismo principalmente para infecções bacterianas<sup>[16,17]</sup>. Os radicais derivados do oxigênio estão envolvidos em diversas ações importantes como reações imunes, longevidade e a peroxidação dos lipídeos celulares, proteínas, carboidratos e DNA. Os fagócitos produzem ânion superóxido gerando oxidantes altamente microbicidas, porém eles podem acarretar danos e participam de um grande número de doenças<sup>[28,36]</sup>.

Nos últimos anos a investigação por novos antioxidantes naturais tem sido intensificada<sup>[29]</sup>. Neste estudo observou menor atividade de fagócitos na presença do extrato de *S. pseudoquina* associados à microesfera de PEG. Esta diminuição da atividade microbicida pode representar uma ação antioxidante do extrato puro Quina do Cerrado. Por outro lado a estimulação da atividade microbicida pela fração obtida através do acetato de etila pode determinar efeitos pró-oxidativos.

## Conclusão

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a microesfera de PEG é capaz de adsorver o extrato do *Strychnos pseudoquina ST. HILL* ("Quina do Cerrado) e sugere que este sistema pode exercer efeitos moduladores sobre a atividade funcional dos fagócitos do sangue humano. A adsorção de *Strychnos pseudoquina ST. HILL* a microesferas de polietilenoglicol surge como um neomaterial para futuras aplicações clínicas em doenças inflamatórias e crônicas degenerativas.

## Agradecimentos

Esta pesquisa recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT processos: N°738264/2008; N°299032/2010 e N° 301610/2010).

## Referências Bibliográficas

- Andrade, C. T.; Coutinho, F. M. B.; Dias, M. I.; Flucas, E.; Oliveira, C. M. F. & Tabak, D. - "Compêndio de Nomenclatura Macromolecular", Epapers, Rio de Janeiro (2002).
- Villanova, J. C. O & Oréfice, R. L. - Polímeros, **20**, p.51 (2010). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009>
- Scott, E. A.; Nichols, M. D.; Kuntz-Willits, R.; Elbert, D. L. - Acta Biomater., **6**, p.29 (2010). PMID:19607945 PMCid:2787810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.009>

- Zanetti, B. G.; Soldi, V. & Lemos-Senna, E. - Rev. Bras. Ciênc. Farmac., **38**, p.2 (2002).
- Alessi, M. L.; Norman, A. I.; Knowlton, S. E.; Ho, D. E. & Greer, S. C. - Macromolecules, **38**, p.22 (2005).
- Violante, I. M. P.; Souza I. M.; Venturini C. L.; Ramalho A. F. S.; Santos R. A.; N. & Ferrari, M. - Braz. J. Pharmacog., **19**, p.452 (2009).
- Granada, A.; Nemen, D.; Dora, C. L.; Neckel, G. L. & Lemos-Senna, E. - Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., **28**, p.129 (2007).
- Veiga-Júnior, V. F. - Rev. Braz. Farmacog., **18**, p.308 (2008).
- Alagusundaram, M.; Madhu, S. C. C.; Umashankari, K., Attuluri V. B. LC. & Ramkanth, S. - Int. J. Chem. Tech. Res., **1**, p.526 (2009).
- Zanetti, B. G.; Soldi, V. & Lemos-Senna, E. - Rev. Bras. Ciências Farmac., **38**, p.2 (2002).
- Corrêa, V. S. C.; Maynié, J. C.; França, E. L. & Honorio-França, A. C. - Rev. Bras. Pl. Med., **8**, p.26 (2006). PMID:17005263.
- França, E. L.; Maynié, J. C., Correa, V. C.; Pereira, U. C. R.; Batalini, C.; Ferrari, C. K. B. & Honorio-França, A. C. - Int. J. Phytomed., **2**, p.354 (2010).
- Cunico, M. M.; Carvalho, J. L. S.; Kerber, V. A.; Higaskino, C. E. K.; Almeida, C. S. C. & Miguel, M. D. - Braz. J. Pharmacog., **14**, p.97 (2004).
- Carneiro-Sampaio, M. M. S.; Da Silva, M. L.; Carbonare, S. B.; Palmeira, P.; Delneri, M. T. Honorio, A. C. & Trabulsi, L. R. - Rev Microbiol., **27**, p.120 (1996).
- Honorio-França, A. C.; Carvalho, M. P. S. M.; Isaac, L.; Trabulsi, L. R. & Carneiro-Sampaio, M. M. S. - Scand. J. Immunol., **46**, p.59 (1997). PMID:9246209. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-86.x>
- França, E. L.; Bitencourt, R. V.; Fujimori, M.; Morais, T. C.; Calderon, I. M. P. & Honorio-França, A. C. - J Microbiol Immunol. Infect., **44**, p.1 (2011). PMID:21531345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2011.01.002>
- França, E. L.; Morceli, G.; Fagundes, D. L. G.; Rugde, M. V. C.; Calderon, I. M. P. & Honorio-França, A. C. - APMIS., **119**, p.710 (2011). PMID:21917008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02789.x>
- AI, H.; Pink, J. J.; Shuai, X. T.; Boothman, D. A. & Gao, J. M. - J. Biomed. Mater. Res. **73A**, p.303 (2005).

19. Wang, X. Q.; Wenk, E.; Zhang, Z. H.; Mennel, L.; Vunjak-Novakovic, G. & Kapla, D. L. - *J. Control Rel.*, **134**, p.81 (2009). PMID:19071168 PMCid:2698962. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.021>
20. Silva, M. A.; Souza-Brito, A. R. M.; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, L. C.; Sannomiya, M. & Vilegas, W. - *Chem. Pharmac. Bull.*, **53**, p.881 (2005). <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.53.881>
21. Honorio-França, A. C.; Marins, C. M. F.; Boldrini, F. & França, E. L. - *Acta Cirúrg. Bras.*, **23**, p.5046 (2008).
22. Silva, M. A.; Souza-Brito, A. R. M.; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, L. C.; Sannomiya, M. & Vilegas, W. - *Braz. J. Pharmacog.*, **15**, p.256 (2005).
23. Roam J. L., Xu H., Nguyen P. K. & Elbert D. L., - *Biomaterials*, **31**, p.8642 (2010). PMID:20719381 PMCid:2949512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.085>
24. Städler, B.; Price, A. D. & Zelikin, A. N. - *Adv. Funct. Mater.*, **21**, p.14 (2011). <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201001676>
25. Li, Y. P.; Pei, Y. Y.; Zhang, X. Y.; Gu, Z. H.; Zhou, Z. H.; Yuan, W. F.; Zhou, J. J.; Zhu, J. H. & Ga, X. J. J. - *Control Rel.*, **71**, p.203 (2001). [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00218-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00218-8)
26. Rozenberg, M.; Loewenschuss, A. & Marcus, Y. - *Spec Acta A*, **54**, p.1819 (1998). [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-1425\(98\)00062-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00062-6)
27. Kuligowski, J.; Quintás, G.; Garrigues, S. & de la Guardia, M. - *Anal Chim Acta.*, **624**, p.278 (2008). PMID:18706334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.055>
28. Velloso, J. C. R.; Khalil, N. M.; Gutierrez, V. O.; Santos, V. A. F. M.; Furlan, M.; Brunetti, I. L. & Oliveira, M. F. - *Elect. J. Pharm.*, **4**, p.119 (2007).
29. Rodrigues, P. A.; Morais, S. M.; Marques, M. M. M.; Aguiar, L. A. & Nunes-Pinheiro, D. C. S. - *Rev. Bras. Pl. Med.*, **10**, p.116 (2008).
30. Freiberg S. & Zhu X. X. *Int. J. Pharmaceut.*, **282**, p.1 (2004). PMID:15336378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>
31. Djaldetti, M.; Salman, H.; Bergman, M. & Bessler, H. - *Micro. Res. Techn.*, **57**, p.421 (2002). PMID:12112425. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10096>
32. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M. & Rodriguez, H. - *Free Rad. Biol. Med.*, **32**, p.1102 (2002). [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00826-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00826-2)
33. Robertson, R. P. - *J. Biol. Chem.*, **279**, p.4351 (2004).
34. Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F. & Martín, V. J. - *Pineal Res.*, **36**, p.1 (2004). PMID:14675124. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>
35. Chunlei, L.; Caixia, W & Hanyu, Y. - *J. Pharm. Pharmacol.*, **64**, p.372 (2012). PMID:22309269. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01422.x>
36. Novelli, E. L.; Rodríguez, N. L.; França, E. L.; Gebra, L. M. N. & Ribas, B. O. - *Braz J Med Biol Res.*, **26**, p.31 (1993). PMID:8220265.

*Enviado: 08/11/11  
Reenviado: 16/03/12  
Aceito: 11/06/12*