

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

**Maiara Rodrigues Salvador**

**ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE COMPLEXOS DE  
CICLODEXTRINAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Governador Valadares

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salvador, Maiara Rodrigues.

ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE COMPLEXOS  
DE CICLODEXTRINAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
ESCLEROSE MÚLTIPLA / Maiara Rodrigues Salvador. -- 2025.

125 p. : il.

Orientadora: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Coorientador: Ângelo Marcio Leite Denadai

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus  
Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida -  
ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia  
Molecular, 2025.

1. Esclerose Múltipla. 2. Imunomodulação. 3. Ácido Ursólico. 4.  
Ródio. 5. Ciclodextrinas. I. Castro, Sandra Bertelli Ribeiro de, orient.  
II. Denadai, Ângelo Marcio Leite , coorient. III. Título.

**Maiara Rodrigues Salvador**

**ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE COMPLEXOS DE  
CICLODEXTRINAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

*Tese apresentada ao Programa Multicêntrico  
de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia  
Molecular da Universidade Federal de Juiz  
de Fora, campus Governador Valadares,  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de doutor. Área de concentração:*

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Ângelo Marcio Leite Denadai - UFJF – GV

Colaboradores: Profa. Dra. Alessandra de Paula Carli - UFVJM

Prof. Dr. Caio César Souza Alves – UFVJM

Prof. Dr. Fernando de Sá Silva - UFJF-GV

Prof. Dr. Heder José Ribeiro - UFJF-GV

Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva – UFJF- GV

Governador Valadares

2025

**Maiara Rodrigues Salvador**

**Estudo da ação imunomoduladora de complexos de ciclodextrinas em modelo experimental de esclerose múltipla**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor(a) em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 05 de novembro de 2025.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. David Henrique Rodrigues**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Flávia Márcia Castro e Silva**  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

**Prof. Dr. Jairo Lisboa Rodrigues**  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Juiz de Fora, 01/09/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Jairo Lisboa Rodrigues, Usuário Externo**, em 05/11/2025, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia Marcia de Castro e Silva, Usuário Externo**, em 05/11/2025, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, Usuário Externo**, em 05/11/2025, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **David Henrique Rodrigues, Professor(a)**, em 06/11/2025, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Meneghin Mendonca, Professor(a)**, em 06/11/2025, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Conferência de Documentos, informando o código verificador **2589702** e o código CRC **65D0AE59**.

---

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor incondicional e pela paciência nos momentos em que precisei me ausentar para me dedicar à pesquisa.

Aos meus amigos, pela leveza e apoio constantes. A todos que, de alguma forma, estiveram ao meu lado nesta jornada e tornaram possível a concretização deste estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força, sabedoria e saúde concedidas ao longo desta caminhada.

À minha família, pelo amor incondicional, pela paciência nos momentos de ausência e pelo apoio constante que me sustentou nos desafios e me impulsionou nas conquistas.

Aos amigos, pela presença, pelas palavras de encorajamento e pelos momentos de leveza que tornaram esta jornada mais significativa.

À Profa. Dra. Sandra B. R. de Castro, minha orientadora, pela orientação firme e generosa, pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos compartilhados ao longo deste percurso.

À Profa. Dra. Alessandra P. Carli (UFVJM), ao Prof. Dr. Ângelo M. L. Denadai (UFJF-GV), ao Prof. Dr. Caio C. S. Alves (UFVJM), ao Prof. Dr. Fernando S. Silva (UFJF-GV), ao Prof. Dr. Heder J. Ribeiro (UFJF-GV) e ao Prof. Dr. Jeferson G. Silva (UFJF-GV), pela colaboração, disponibilidade e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de alunos de Iniciação Científica — Ana C. R. Silva, Eduarda L. Franco, Jully C. S. Viana, Maria A. G. Carneiro, Vitória A. Lopes e Yrion K. A. Lima — pelo comprometimento, entusiasmo e auxílio nas etapas experimentais.

Aos colegas de pós-graduação Gefferson L. S. Gomes, Mariana A. R. Rezende e Oswaldo C. Junior, pela parceria, amizade e colaboração ao longo deste percurso.

À Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pelo espaço, suporte técnico e estrutura disponibilizados para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), pelo acolhimento e pelas oportunidades de aprendizado e crescimento científico.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e FINDEP, pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo, deixo meu mais sincero agradecimento e reconhecimento.

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica autoimune neurodegenerativa no sistema nervoso central (SNC), para a qual os tratamentos convencionais são limitados por alto custo, efeitos adversos e eficácia parcial. Nesse contexto, a busca por alternativas mais eficazes, seguras e acessíveis levou à investigação do ácido ursólico (AU) e de compostos de ródio (Rh). O AU possui reconhecida ação anti-inflamatória e imunomoduladora, no entanto, suas desfavoráveis características físico-químicas o tornam um desafio do ponto de vista farmacotécnico. Por outro lado, complexos de Rh com ciclodextrinas já apresentaram efeito imunomodulador *in vitro* e *in vivo*, porém sua eficácia em modelos de EM permanece inexplorada. Desta forma, o presente trabalho objetivou sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito imunomodulador de complexos de AU com poli-beta-ciclodextrina (AU/p $\beta$ CD) e de Rh com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Rh/HP $\beta$ CD) no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). A caracterização físico-química seguiu uma abordagem estratégica: a formação do Rh/HP $\beta$ CD, em continuidade a um trabalho prévio, foi confirmada por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e por análises térmicas (TGA/DTA). Já o complexo inédito AU/p $\beta$ CD foi submetido a uma investigação aprofundada para elucidar seu comportamento supramolecular, utilizando, além de FTIR e TGA/DTA, estudos de solubilidade de fase, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta. A avaliação biológica iniciou-se *in vitro*, com ensaios de citotoxicidade (MTT) e de produção de óxido nítrico (NO) para o AU/p $\beta$ CD, e prosseguiu com a avaliação *in vivo* de ambos os complexos no modelo EAE em camundongos C57BL/6 fêmeas. A caracterização aprofundada do AU/p $\beta$ CD revelou a formação de um complexo de inclusão com estequiometria 1:1, resultando em um aumento da solubilidade do AU e na formação de nanopartículas coloidais estáveis em meio aquoso. *In vitro*, o AU/p $\beta$ CD reduziu a produção de NO em macrófagos, demonstrando maior potência do que o AU isolado e sem apresentar citotoxicidade em concentrações terapêuticas. *In vivo*, ambos os complexos, assim como seus compostos isolados, atenuaram significativamente o escore de incapacidade neurológica da EAE. Notavelmente, o Rh isolado demonstrou a ação mais rápida e potente durante o pico inflamatório da doença. Análises *ex vivo* do SNC revelaram uma ação dupla e

compartimentalizada: no cérebro, os tratamentos promoveram uma clara imunomodulação, com redução da citocina pró-inflamatória IL-12p70 e do infiltrado inflamatório; em contrapartida, na medula espinhal, exerceram um potente efeito neuroprotetor, diminuindo a desmielinização mesmo sem reduzir o infiltrado inflamatório local. Conclui-se que os complexos de AU e Rh atenuam a severidade da EAE por meio de um mecanismo combinado de imunomodulação central e de neuroproteção direta. O Rh emergiu como um agente terapêutico de alta potência, enquanto a complexação do AU mostrou-se uma estratégia farmacotécnica bem-sucedida tanto na melhoria das propriedades físico-químicas quanto na manutenção da eficácia, o que justifica a continuidade das investigações para o desenvolvimento de novas terapias para a EM.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla, Imunomodulação, Neuroproteção, Ácido Ursólico, Ciclodextrinas, Ródio.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease that causes neurodegeneration in the central nervous system (CNS), for which conventional treatments are limited by high cost, adverse effects, and partial efficacy. In this context, the search for more effective, safe, and accessible alternatives has led to the investigation of Ursolic Acid (UA) and Rhodium (Rh) compounds. UA possesses well-established anti-inflammatory and immunomodulatory actions; however, its unfavorable physicochemical characteristics present a pharmacotechnical challenge. On the other hand, while Rh complexes with cyclodextrins have previously shown immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*, their efficacy in MS models remained unexplored. Therefore, this study aimed to synthesize, characterize, and evaluate the immunomodulatory effect of a UA complex with poly-beta-cyclodextrin (UA/p $\beta$ CD) and an Rh complex with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (Rh/HP $\beta$ CD) in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) model. The physicochemical characterization followed a strategic approach: the formation of Rh/HP $\beta$ CD, building upon previous work, was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis (TGA/DTA). The novel UA/p $\beta$ CD complex was subjected to an in-depth investigation to elucidate its supramolecular behavior, which included, in addition to FTIR and TGA/DTA, phase solubility studies, dynamic light scattering (DLS), and zeta potential analysis. The biological evaluation began *in vitro* with cytotoxicity (MTT) and nitric oxide (NO) production assays for UA/p $\beta$ CD, and subsequently proceeded to the *in vivo* evaluation of both complexes in the EAE model using female C57BL/6 mice. The in-depth characterization of UA/p $\beta$ CD revealed the formation of an inclusion complex with a 1:1 stoichiometry, resulting in increased UA solubility and the formation of stable colloidal nanoparticles in an aqueous medium. *In vitro*, the UA/p $\beta$ CD complex reduced NO production in macrophages, proving more potent than uncomplexed UA and exhibiting no cytotoxicity at therapeutic concentrations. *In vivo*, both complexes, as well as their parent compounds, significantly attenuated the neurological disability score of EAE. Notably, uncomplexed Rh demonstrated the most rapid and potent action during the inflammatory peak of the disease. *Ex vivo* analyses of the CNS revealed a dual,

compartmentalized action: in the brain, the treatments promoted clear immunomodulation, with a reduction in the pro-inflammatory cytokine IL-12p70 and inflammatory infiltrate. In contrast, in the spinal cord, they exerted a potent neuroprotective effect, decreasing demyelination even without reducing the local inflammatory infiltrate. In conclusion, the UA and Rh complexes attenuate the severity of EAE through a combined mechanism of central immunomodulation and direct neuroprotection. Rh emerged as a highly potent therapeutic agent, while the complexation of UA proved to be a successful pharmacotechnical strategy for both improving physicochemical properties and maintaining efficacy, thus warranting continued investigation into the development of new therapies for MS.

Keywords: Multiple Sclerosis, Immunomodulation, Neuroprotection, Ursolic Acid, Cyclodextrins, Rhodium.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais hipóteses de gatilho para o início da esclerose múltipla.....	23
Figura 2 - Esquema representativo da fase efetora da esclerose múltipla no sistema nervoso central.....	24
Figura 3 – Estrutura química das ciclodextrinas.....	32
Figura 4 – Estrutura química do ácido ursólico.....	36
Figura 5 – Fluxograma do delineamento experimental.....	39
Figura 6 - Espectros de FTIR do Rh, do HP $\beta$ CD, do Rh/HP $\beta$ CD e do MM na região de 4000 a 400 cm $^{-1}$ em KBr.....	52
Figura 7 - Espectros de FTIR do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM na região de 4000 a 400 cm $^{-1}$ em KBr.....	54
Figura 8 - Termogramas de TGA de Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.....	55
Figura 9 - Termogramas de TGA do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.....	55
Figura 10 - Termogramas de DTA do Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.....	56
Figura 11 - Termogramas de DTA do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.....	57
Figura 12 – Diagrama de solubilidade de fase do AU em função da p $\beta$ CD.....	58
Figura 13 – Valores de Dh, PZ e K do AU e do AU/p $\beta$ CD.....	59
Figura 14 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7..	
60	
Figura 15 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de macrófagos J774A.1...	61
Figura 16 - Efeito dos tratamentos na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7.....	62
Figura 17 - Efeito dos tratamentos na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774A.1.....	62
Figura 18 – Massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não para EAE.....	63
Figura 19 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6 imunizados ou não para EAE e tratados com Rh, HP $\beta$ CD ou Rh/HP $\beta$ CD.....	64
Figura 20 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6	

imunizados ou não para EAE e tratados com AU, p $\beta$ CD ou AU/p $\beta$ CD.....	65
Figura 21 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6 durante o período de tratamento (14º–20º dpi): comparação entre tratamentos eficazes.....	66
Figura 22 - Níveis de IL-12p70 no homogeneado cerebral de camundongos C57BL/6 com EAE.....	67
Figura 23 - Níveis de IL-12p70 na medula espinhal de camundongos C57BL/6 com EAE.....	68
Figura 24 - Escore de inflamação do cérebro de camundongos com EAE.....	69
Figura 25 - Micrografias de cortes transversais de cérebro (5 $\mu$ m), corados com hematoxilina e eosina (H&E).....	70
Figura 26 - Escore de inflamação da medula espinhal de camundongos com EAE..	71
Figura 27 - Micrografias de cortes longitudinais de medula espinhal (5 $\mu$ m), coradas com hematoxilina e eosina (H&E).....	72
Figura 28 - Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos com EAE.....	73
Figura 29 - Micrografias de cortes longitudinais de medula espinhal (5 $\mu$ m), coradas com Luxol Fast Blue (LFB).....	74

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas.....	31
Tabela 2 - Concentrações de p $\beta$ CD utilizadas no experimento de solubilidade de fase.....	43
Tabela 3 - Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho do Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.....	53
Tabela 4 - Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.....	53

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Características farmacológicas, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais TMDs usados no SUS.....	28
Quadro 2 - Protocolos de Imunização com camundongos C57BL/6 e peptídeo MOG35–55 para a Indução de Diferentes Fenótipos de EAE.....	30
Quadro 3 - Escala de incapacidade neurológica (EIN) para avaliação da EAE.....	48
Quadro 4 – Comparativo estrutural e físico-químico dos complexos.....	78

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

βCD - beta-ciclodextrina  
γCD - gama-ciclodextrina  
AU - ácido ursólico  
AU/βCD - complexo de ácido ursólico com beta-ciclodextrina  
AU/γCD - complexo de ácido ursólico com gama-ciclodextrina  
AU/HPβCD - complexo de ácido ursólico com hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
AU/HPyCD - complexo de ácido ursólico com hidroxipropil-gama-ciclodextrina  
AU/pβCD - complexo de ácido ursólico com poli-beta-ciclodextrina  
BHE – barreira hematoencefálica  
BHM - barreira hemato-medular  
CD - ciclodextrina  
DAMP – padrões moleculares associados a dano  
Dh – diâmetro hidrodinâmico  
DLS – fotometria de espalhamento de luz dinâmica  
DMSO - dimetilsulfóxido  
dpi – dias pós indução  
DTA – análise térmica diferencial  
EAE – encefalomielite autoimune experimental  
EBV – vírus Epstein-Barr  
EM – esclerose múltipla  
EMRR – esclerose múltipla remitente recorrente  
EMPP – esclerose múltipla progressiva primária  
EMSP – esclerose múltipla progressiva secundária  
FTIR – espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier  
GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos  
H&E – hematoxilina e eosina  
HPβCD - hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
HPyCD - hidroxipropil-gama-ciclodextrina  
 $H_3PO_4$  – ácido fosfórico  
INF-γ – interferon-gama

i.p. - intraperitoneal  
ITC – titulações calorimétricas isotérmicas  
KBr – brometo de potássio  
LPS - lipopolissacarídeo  
MBP – proteína básica de mielina  
MELD – microeletroforese laser doppler  
MM – mistura mecânica  
MTT: brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio  
NaNO<sub>2</sub> – nitrato de sódio  
NPH - nanoprecipitado hidrofóbico  
NF-κB – fator nuclear Kappa B  
NO – óxido nítrico  
 $\text{p}\beta\text{CD}$  - poli-beta-ciclodextrina  
PAMP – padrões moleculares associados a patógenos  
PBS – formalina tamponada  
PZ – potencial zeta  
RH - ródio  
 $\text{RhCl}_3$  – cloreto de ródio  
Rh/HP $\beta$ CD – complexo de ródio com hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
SCI – síndrome clínica isolada  
SNC – sistema nervoso central  
SRI – síndrome radiologicamente isolada  
SUS - Sistema Único de Saúde  
Teff – célula T efetora  
TGA – análise termogravimétrica  
TMDs – terapias modificadoras de doença  
TNF – fator de necrose tumoral  
TS – teste de solubilidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM).....	22
2.2 ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL.....	29
2.3 CICLODEXTRINAS (CDs).....	31
2.4 RÓDIO (Rh).....	34
2.5 ÁCIDO URSÓLICO (AU).....	35
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	40
4.2.1 Químicos e reagentes.....	40
4.2.2 Síntese da p $\beta$ CD.....	41
4.2.3 Síntese dos complexos.....	41
4.2.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.2.5 Análise de termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA).....	42
4.2.6 Análise de solubilidade de fase (SF).....	42
4.2.7 Análise de fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ).....	44
4.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPLEXOS.....	44
4.3.1 Análises in vitro - macrófagos J774.A1 e RAW 264.7.....	44
4.3.1.1 Análise de viabilidade celular por MTT.....	45
4.3.1.2 Análise de NO pelo método de Griess.....	46
4.3.2 Análise in vivo – encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	46

4.3.2.1 Indução da EAE.....	46
4.3.2.2 Avaliações clínicas e tratamentos.....	47
4.3.3 Dosagem de citocina IL-12p70.....	48
4.3.4 Histopatologia.....	49
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	52
5.1.1 FTIR.....	52
5.1.2 TGA e DTA.....	54
5.1.3 SF.....	57
5.1.4 DLS e PZ.....	58
5.2 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPLEXOS.....	60
5.2.1 Análise in vitro - macrófagos J774.A1 e RAW 264.7.....	60
5.2.2 Análise in vivo - EAE.....	63
5.2.3 Dosagem de citocina IL-12p70.....	67
5.2.4 Histopatologia.....	69
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO II - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica e autoimune que se destaca como a principal causa de incapacidade não traumática em jovens adultos, com início entre os 20 e 50 anos e afetando duas vezes mais mulheres que homens (Cheng et al., 2017; Gholamzad et al., 2019; Haki et al., 2024; Koriem, 2016; Moghaddam et al., 2021; Montalban et al., 2018; Oliveira et al., 2024; Qian et al., 2023; Walton et al., 2020). Caracterizada por um quadro de neurodegeneração do sistema nervoso central (SNC), a doença leva à formação de lesões focais no cérebro e na medula espinhal, com desmielinização primária, perda axonal e atrofia progressiva (Cheng et al., 2017; Gholamzad et al., 2019; Haki et al., 2024; Oliveira et al., 2024). Estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento acentuado na incidência desta enfermidade, fenômeno que pode estar associado tanto à melhoria no diagnóstico quanto ao aumento da exposição a fatores de risco (Koch-Henriksen; Magyari, 2021; Moghaddam et al., 2021; Qian et al., 2023).

Os medicamentos utilizados na EM possuem, majoritariamente, ação imunossupressora e imunomoduladora, atuando sobre as células do sistema imunológico envolvidas na cascata inflamatória da doença (Cheng et al., 2017; Samjoo et al., 2021; Wei; Yu; Wei, 2023). No entanto, essas terapias apresentam limitações importantes, como eficácia parcial e elevado potencial para efeitos colaterais graves, como infecções, leucemia aguda relacionada ao tratamento, reações cutâneas, cardiotoxicidade, entre outros (Moghaddam et al., 2021; Wei et al., 2021). Além disso, o elevado custo desses tratamentos impõe um desafio significativo aos orçamentos de saúde pública (Burman, 2021; CMED, 2025; Dargahi et al., 2017; Diniz et al., 2018; Śladowska et al., 2022). Diante desses desafios, a pesquisa por novas terapias mais eficazes, seguras e acessíveis é fundamental para a melhoria do tratamento da EM.

Nesse contexto, substâncias com potencial de ação imunomoduladora, como o metal de transição ródio (Rh) e o triterpeno pentacíclico ácido ursólico (AU), vêm sendo investigadas. Estudos mostram que compostos de Rh têm a capacidade de reduzir a liberação de fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-6,

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e NF-κB (Carvalho et al., 2025; Song; You; Chen, 2023; Zheng et al., 2024). Já o AU é reconhecido por sua ação anti-inflamatória e neuroprotetora, capaz de aprimorar a remielinização em modelos experimentais (Guo et al., 2021; Honarvar et al., 2022; Rai et al., 2019; Ramos-Hryb et al., 2017; Salau et al., 2021; Scherrer et al., 2023; Seo et al., 2018; Zafar et al., 2022; Zhang et al., 2020).

Embora ambos os compostos apresentem promissoras propriedades anti-inflamatórias, suas características físico-químicas, como a baixa solubilidade e biodisponibilidade do AU (Lei et al., 2023; Liu et al., 2023; Sun et al., 2020; Zafar et al., 2022), e a rápida excreção e acúmulo em órgão como rins, coração e baço do Rh (Czerczak et al., 2012), tornam seu emprego terapêutico um desafio farmacotécnico. A fim de contornar estes problemas, a complexação com ciclodextrinas (CDs) apresenta-se como uma solução promissora. Essas moléculas são oligossacarídeos cíclicos, capazes de formar complexos supramoleculares de inclusão, oferecendo vantagens como baixo custo, grande disponibilidade e baixa toxicidade (Da Silva Júnior et al., 2019; Lv et al., 2019; Venturini et al., 2008; Vukic et al., 2020).

Estudos prévios com o complexo de Rh com hidroxipropil-β-ciclodextrina (Rh/HPβCD) demonstraram seu potencial imunomodulador, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de NF-κB *in vitro*, além de reduzir o edema de pata em modelos inflamatórios *in vivo* (Carvalho et al., 2025). Para o AU é possível encontrar trabalhos que apresentam a complexação do AU com beta ciclodextrina (βCD) (Huang et al., 2017; Song et al., 2019), gama ciclodextrina (γCD) (Inoue et al., 2023; Žaloudková et al., 2020; Zong; Bi, 2012), hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) (Inoue et al., 2023; Oprean et al., 2016; Quan et al., 2009; Soica et al., 2014; Song et al., 2019) e hidroxipropil-gama-ciclodextrina (HPγCD) (Oprean et al., 2016). Estes complexos vêm sendo testados para ação antitumoral (Oprean et al., 2016; Soica et al., 2014; Song et al., 2019) e hepatoprotetora (Žaloudková et al., 2020).

Embora a complexação de Rh e de AU com CDs já tenha sido investigada, a literatura apresenta lacunas significativas. Até o momento, não há estudos que avaliem a ação do complexo Rh/HPβCD em modelos de EM, nem que explorem o

potencial dos complexos de AU/CDs no tratamento dessa doença. Adicionalmente, este trabalho é o primeiro a investigar a complexação do AU com a poli-beta-ciclodextrina ( $\text{p}\beta\text{CD}$ ), tornando-o o primeiro a estudar essa combinação. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito imunomodulador dos complexos Rh/HP $\beta$ CD e AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$  no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

A EM é uma condição autoimune crônica que afeta o cérebro e a medula espinhal, caracterizada por neuroinflamação e desmielinização. Ela é a principal doença não traumática capaz de causar incapacidade em jovens adultos, com idade média global de diagnóstico aos 32 anos (Gholamzad et al., 2019; Hauser; Cree, 2020; Koriem, 2016; Montalban et al., 2018; Quan et al., 2009; Walton et al., 2020). A EM apresenta maior prevalência entre mulheres, na proporção de 2:1 em relação aos homens (Multiple Sclerosis International Federation, 2020).

Dados demonstram que em 2017, cerca de 1.761.078 pessoas em todo o mundo tinham EM, com uma prevalência global de 21,70 por 100.000 pessoas e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 0,23 mortes por 100.000 habitantes (Moghaddam et al., 2021). Em 2019, foram registrados no mundo cerca de 59.345 novos casos e 22.439 mortes por EM (Qian et al., 2023).

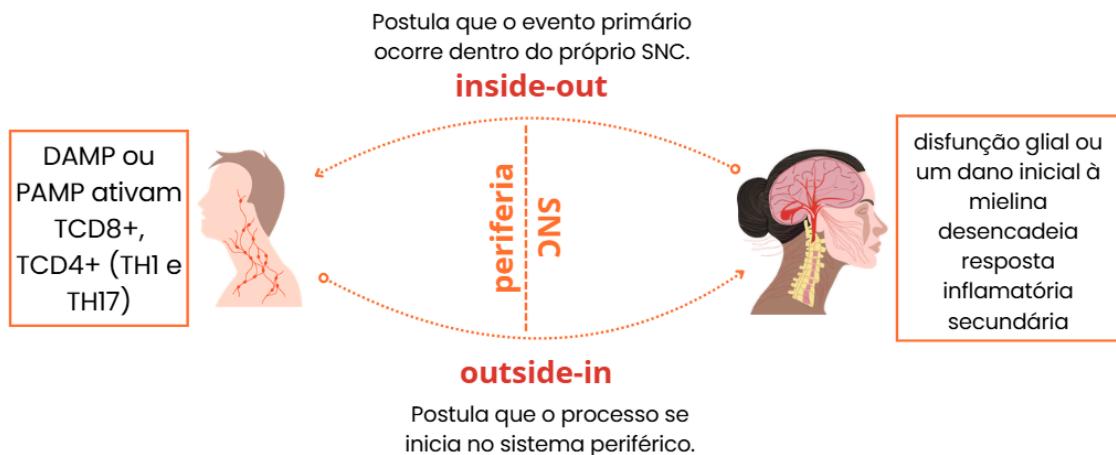
Atualmente, estima-se que cerca de 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo vivam com EM, sendo que, destas, pelo menos 30.000 têm menos de 18 anos de idade (Gombolay et al., 2025; Multiple Sclerosis International Federation, 2020; Walton et al., 2020). Os estudos indicam que o número de casos vem crescendo, possivelmente em decorrência da melhoria do diagnóstico mundial, da maior expectativa de vida e do crescimento populacional global e do aumento da exposição a fatores de risco (Moghaddam et al., 2021; Multiple Sclerosis International Federation, 2020; Qian et al., 2023). No Brasil, a prevalência de esclerose múltipla é estimada em 14,5 casos por 100.000 habitantes, sendo mais prevalente entre brancos (74%) e no sexo feminino (76,3%) (Moura et al., 2025).

A EM é uma doença crônica, autoinflamatória e neurodegenerativa, que atinge o SNC levando à formação de lesões focais no cérebro e na medula espinhal, caracterizadas por desmielinização primária, perda axonal e atrofia progressiva (Cheng et al., 2017; Gholamzad et al., 2019). A etiologia da EM ainda não é bem conhecida, no entanto estudos indicam que a predisposição genética e os desencadeadores ambientais (tabagismo, deficiência de vitamina D na infância

e adolescência, obesidade e infecções – em particular o vírus Epstein-Barr (EBV) – estão envolvidos no desenvolvimento da doença (Attfield et al., 2022; Lazibat, 2018; Paul; Comabella; Gandhi, 2019; Rodríguez Murúa; Farez; Quintana, 2022).

A patogênese da EM é complexa, e o gatilho inicial que desencadeia a doença ainda é objeto de intenso debate. Atualmente, as discussões concentram-se em duas hipóteses principais (Figura 1). A primeira, conhecida como 'outside-in', postula que o processo se inicia no sistema periférico (Luchicchi; Preziosa; 't Hart, 2021; Titus et al., 2020). Neste modelo, a liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs), como o vírus Epstein-Barr, atuaria como o gatilho para a ativação de células T autorreativas na periferia.(Cheng et al., 2017; Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020). Uma vez ativadas, essas células imunes, incluindo células mieloides e células T inflamatórias, rompem a barreira hematoencefálica (BHE) e migram para o Sistema Nervoso Central (SNC) (Cheng et al., 2017; Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020).

Figura 1 - Principais hipóteses de gatilho para o início da esclerose múltipla.



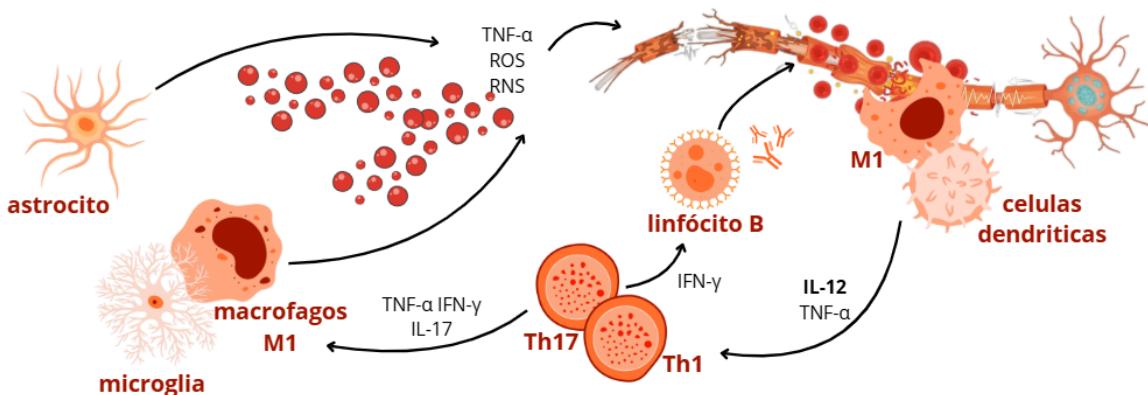
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em contrapartida, a hipótese "inside-out" sugere que o evento primário ocorre dentro do próprio SNC (Luchicchi; Preziosa; 't Hart, 2021; Titus et al., 2020). Nessa perspectiva, uma disfunção glial ou um dano inicial à mielina, por

razões ainda não esclarecidas, levaria à liberação de抗ígenos do SNC (Luchicchi; Preziosa; 't Hart, 2021; Paul; Comabella; Gandhi, 2019; Sen et al., 2020; Sharma et al., 2010; Titus et al., 2020). Esses抗ígenos seriam então apresentados ao sistema imune periférico, desencadeando uma resposta inflamatória secundária que amplifica e perpetua o dano (Ellen et al., 2023; Sen et al., 2020).

Independentemente do gatilho primário, é consenso que a fase efetora da doença envolve uma interação crítica entre o sistema imunológico, a glia e os neurônios (Figura 2) (Cheng et al., 2017; Díaz; Zarco; Rivera, 2019; Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020). No SNC, por exemplo, as células mieloides liberam IL-1 $\beta$  e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), levando à amplificação da resposta Th17 e ao dano tecidual característico da doença (Bierhansl et al., 2022; Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020; McGinley et al., 2018).

Figura 2 - Esquema representativo da fase efetora da esclerose múltipla no sistema nervoso central.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As células T helper (Th), Th1 e Th17, liberam citocinas, tais como GM-CSF, IL-17, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) que ativam a micróglia (Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020; McGinley et al., 2018). A micróglia apresenta aos linfócitos a proteína básica da mielina (MBP), reativando as células T autorreativas (Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane,

2020; McGinley et al., 2018). Consequentemente, essa reativação impulsiona a expansão clonal dessas células e a liberação maciça de mediadores inflamatórios. Isso leva a microglia a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de produtos citotóxicos e proteases, promovendo a destruição da mielina e dos oligodendrócitos. O resultado é uma resposta inflamatória tóxica que leva à morte neuronal e déficits neurológicos (Bierhansl et al., 2022; Govindarajan; De Rivero Vaccari; Keane, 2020; Lazibat, 2018; McGinley et al., 2018).

Pacientes com EM apresentam quadros de exacerbação ou recaída, definidos pelo Painel Internacional sobre o Diagnóstico de Esclerose Múltipla como “sintomas relatados pelo paciente ou sinais observados objetivamente, típicos de um evento desmielinizante inflamatório agudo no SNC, atual ou histórico, com duração de pelo menos 24 horas, na ausência de febre ou infecção” (Polman et al., 2011). O histórico de ataques e os dados de ressonância magnética nuclear dos pacientes são utilizados para classificar a doença em 5 fenótipos, que auxiliam na escolha do tratamento e dos ensaios clínicos (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014).

Clinicamente a EM é classificada em: síndrome clínica isolada (SCI), síndrome radiologicamente isolada (SRI), esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR), esclerose múltipla progressiva primária (EMPP) e esclerose múltipla progressiva secundária (EMPS) (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014). As duas primeiras classificações (SCI e SRI) referem-se a pacientes que ainda não podem ser diagnosticados com EM, mas que apresentam indícios da doença. Os pacientes classificados como SCI são aqueles que apresentam sintomas característicos de desmielinização inflamatória, mas ainda não atenderam aos critérios de disseminação no tempo característicos da EM (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014). Já os pacientes classificados em SRI são aqueles que apresentam achados radiológicos incidentais que sugerem desmielinização inflamatória, mas não apresentam sinais ou sintomas clínicos (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014).

As demais classificações dizem respeito a pacientes que já apresentam o diagnóstico fechado de EM. Onde EMRR refere-se a pacientes que apresentam

quadros de ataques agudos, com recuperação completa ou incompleta, e períodos de relativa estabilidade clínica entre eles (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014). EMPP descreve pacientes com declínio progressivo da função neurológica desde o início da doença (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014). EMPS é definida pela progressão gradual de incapacidade após um curso recidivante inicial, ocorre em até 40% dos pacientes 20 anos após o evento inicial (Katz Sand, 2015; Lublin et al., 2014).

No Brasil, a confirmação diagnóstica dessas apresentações clínicas e a elegibilidade para tratamento no Sistema Único de Saúde (SUS) seguem o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), atualizado em 2024, que adota os critérios de McDonald revisados em 2017 (Ministério da Saúde, 2023, 2024). Dada a complexidade da doença e a inexistência de um biomarcador específico, o diagnóstico baseia-se na demonstração de disseminação de lesões no tempo e no espaço dentro do SNC (Ministério da Saúde, 2023, 2024). Embora o diagnóstico possa ser clínico em pacientes com múltiplos surtos e evidências objetivas, o protocolo nacional preconiza o suporte indispensável da ressonância magnética para identificar lesões em áreas-chave (periventricular, cortical/justacortical, infratentorial e medula espinhal) e excluir diagnósticos diferenciais, podendo-se utilizar a presença de bandas oligoclonais no líquor para corroborar a disseminação no tempo em casos específicos (Ministério da Saúde, 2023, 2024).

Embora não exista cura para a EM, diversos tratamentos têm sido empregados para retardar a progressão da doença e amenizar seus sintomas. Estes incluem tratamentos adjuvantes (TA), intervenções não farmacológicas (TNF) e tratamentos modificadores da doença (TMD) (Duan et al., 2023; Machado et al., 2024). Os TA visam o controle sintomático da EM com o uso de antidepressivos, analgésicos, relaxantes musculares, anticonvulsivantes, entre outros fármacos, conforme as necessidades individuais do paciente (Machado et al., 2024). Já as TNF englobam mudança de hábitos de vida, fisioterapia, psicoterapia, terapia ocupacional e terapias alternativas (Machado et al., 2024).

Os TMD são os principais tratamentos utilizados e têm como alvo células do sistema imunológico envolvidas na cascata inflamatória (Cheng et al., 2017;

Samjoo et al., 2021). Os TMD são mais eficazes nos estágios iniciais da EMRR e perdem eficácia à medida que a doença progride, ou seja, não apresentam bons resultados em pacientes classificados como EMPP e EMPS (Samjoo et al., 2021). No Brasil, os principais TMD disponibilizados pelo SUS incluem as betainterferonas, acetato de glatirâmer, teriflunomida, azatioprina, fumarato de dimetila, fingolimode, natalizumabe, cladribina e alemtuzumabe (Ministério da Saúde, 2023, 2024). As características farmacológicas desses medicamentos, incluindo seus mecanismos de ação e principais efeitos adversos, estão detalhadas no Quadro 1.

Os TMD apresentam um custo elevado, o que representa uma barreira ao acesso, especialmente em países subdesenvolvidos (Burman, 2021). O custo dos tratamentos varia muito conforme a localidade e a classificação da doença. Em 2017, nos EUA o custo anual por paciente que utiliza uma TMD variava de US\$ 72.066 a US\$ 121.053, dependendo da idade e do sexo (Bebo et al., 2022; Nicholas et al., 2020). Na Europa, até 2019, os custos médios anuais por paciente foram de € 31.007 (em valores de 2021) para EMRR e de € 58.475 para EMPS. Os custos médios anuais por paciente foram de € 31.007 (em valores de 2021) para EMRR e de € 58.475 para EMPS (Chataway et al., 2021). No Brasil um estudo de coorte que analisou os dispêndios do SUS entre 2000 e 2015 identificou um gasto médio anual por paciente de US\$13.544,40 (em valores de 2017) (Diniz, 2017). Outra estimativa, no período de 2011 e 2012, apontava custo direto total médio por ano foi de US\$ 19.012,32 (em valores de 2016), sendo que 90% dos custos estavam diretamente ligados à TMD (Da Silva et al., 2016).

Outra dificuldade nos TMD é o elevado potencial para efeitos colaterais graves, que podem incluir sintomas semelhantes aos da gripe, reações no local da injeção, aumento do risco de infecções, leucoencefalopatia multifocal progressiva e bradicardia, disfunção intestinal, infecções oportunistas, sepse, distúrbios hematológicos, hepatotoxicidade, entre outros (Burman, 2021; Callegari; Derfuss; Galli, 2021; Nascimento et al., 2023; Wei et al., 2021).

Quadro 1 - Características farmacológicas, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais TMDs usados no SUS.

Linha de Tratamento	Fármaco	Mecanismo de Ação	Principais Efeitos Adversos
<b>1ª Linha (EMRR de Baixa/Moderada Atividade**)</b>	<b>Betainterferona (1a e 1b)</b>	Antiviral/Imunomodulador; reduz o trânsito de células inflamatórias para o SNC.	Síndrome gripal (febre, mialgia), depressão, reações locais e alterações hepáticas/tireoidianas.
	<b>Acetato de Glatirâmer</b>	Imunomodulador; induz células T reguladoras e Th2 anti-inflamatórias.	Reações no local (dor, lipoatrofia), reação pós-injeção (dispneia, dor torácica, palpação).
	<b>Teriflunomida</b>	Inibidor da enzima DHODH; efeito citostático em linfócitos ativados.	Hepatotoxicidade, alopecia, náusea, diarreia e risco de teratogenicidade (proibido na gestação).
	<b>Fumarato de Dimetila</b>	Imunomodulador (via Nrf2) e redução de células T CD8+.	<i>Flushing</i> (rubor), desconforto gastrintestinal (diarreia, dor), linfopenia e risco raro de LEMP.
	<b>Azatioprina***</b>	Imunossupressor inespecífico.	Infecções, leucopenia, anemia, disfunção hepática e hipersensibilidade.
<b>2ª Linha (EMRR após falha ou Alta Atividade*)</b>	<b>Fingolimode</b>	Modulador de receptores S1P; sequestra linfócitos nos linfonodos.	Bradicardia (monitorar na 1ª dose), bloqueio AV, edema macular, infecções e elevação hepática.
<b>Alta Atividade / 3ª Linha (EMRR Grave ou Falha)</b>	<b>Natalizumabe</b>	Anti-integrina alfa-4; bloqueia a entrada de leucócitos no cérebro.	Risco de LEMP (infecção cerebral grave pelo vírus JC), reações alérgicas, fadiga e cefaleia.
	<b>Cladribina Oral</b>	Análogo de nucleosídeo; causa depleção seletiva de linfócitos T e B por apoptose.	Linfopenia grave, <i>Herpes zoster</i> , infecções oportunistas e risco de malignidades.
	<b>Alemtuzumabe</b>	Anti-CD52; causa lise (destruição) profunda e prolongada de linfócitos T e B.	Reações infusionais graves, infecções e autoimunidade secundária (tireoide, plaquetas, rins).

\*Alta Atividade: Pacientes com ≥ 2 surtos/ano e lesões ativas na RM (sem tratamento prévio) ou 1 surto/ano com novas lesões (em tratamento). \*\*Baixa/Moderada Atividade: Casos com atividade da doença que não atingem os critérios de gravidade acima. \*\*\*Azatioprina é reservada para casos de baixa adesão a outras terapias de 1ª linha. SNC: Sistema Nervoso Central; LEMP: Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva. TMDs: terapias modificadoras da doença. Fonte: Elaborado pela autora com base em Ministério da Saúde, 2023, 2024.

## 2.2 ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é um modelo animal de inflamação do SNC mais utilizado para estudar tratamentos, fisiopatologia e eventos desencadeadores da EM (Santamaria; Hackett, 2003; Titus et al., 2020). O modelo recapitula com notável fidelidade aos principais eventos da EM, incluindo a infiltração de células imunes no SNC, a desmielinização, o dano e a perda de axônios e a cicatrização glial reativa (Cheng et al., 2017; Constantinescu et al., 2011). Essa semelhança patológica resulta em manifestações clínicas nos animais, como fraqueza motora e paralisia progressiva, que espelham os déficits neurológicos observados no paciente (Cheng et al., 2017; Constantinescu et al., 2011).

É importante destacar que o curso clínico e patológico da EAE é diretamente dependente da espécie e da linhagem do animal escolhido (por exemplo, C57BL/6, SJL/J, Biozzi), assim como do antígeno (por exemplo, glicoproteína de oligodendrócito de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica de mielina (PLP)) (Bittner et al., 2014; Santamaria; Hackett, 2003). Uma vez que mudanças no protocolo de indução podem levar a cursos distintos da doença (agudo, crônico progressivo ou recorrente-remitente), é recomendado que durante as análises e interpretações dos estudos, seja levado em conta o modelo experimental descrito (Bittner et al., 2014; Santamaria; Hackett, 2003).

Independentemente dos diferentes modelos, a EAE é um modelo mediado por células T com ativação periférica e subsequente quebra da BHE, com dano efetor no SNC (Constantinescu et al., 2011). Esses eventos são seguidos pela secreção de mediadores pró-inflamatórios, que ampliam ainda mais a resposta inflamatória, sendo que os linfócitos Th1 produzem principalmente IFN- $\gamma$ , enquanto os Th17 são linfócitos T produtores de IL-17 (Constantinescu et al., 2011).

A imunização de camundongos C57BL/6 com o peptídeo MOG<sub>35–55</sub> em CFA pode levar à indução de três formas distintas da doença: monofásica, crônica progressiva e remitente-recorrente, sendo que a manifestação de um fenótipo

específico é uma consequência direta e previsível do protocolo de imunização empregado, que varia as doses do antígeno e dos adjuvantes (Quadro 2) (Berard et al., 2010; Bittner et al., 2014; Huntemann et al., 2022; Voskuhl; MacKenzie-Graham, 2022). A forma monofásica é caracterizada por uma resposta imunológica predominantemente impulsionada por células T CD4+, com lesões localizadas principalmente na medula espinhal, que resultam em desmielinização e morte celular axonal, manifestando-se clinicamente como uma paralisia flácida ascendente (Bittner et al., 2014; Stimmer; Fovet; Serguera, 2018). A forma crônica progressiva, utilizada neste trabalho, apresenta uma carga de lesões aumentada com inflamação que piora com o tempo, perda progressiva de mielina, dano axonal severo e uma maior predominância de células T CD8+ no SNC (Berard et al., 2010; Huntemann et al., 2022). Por fim, a forma remitente-recorrente é definida por uma fase inicial de inflamação e desmielinização, seguida por uma fase de remissão na qual essas características são em grande parte resolvidas, com uma redução acentuada no número de lesões e na área total lesionada na medula espinhal (Berard et al., 2010).

**Quadro 2 - Protocolos de Imunização com camundongos C57BL/6 e peptídeo MOG<sub>35-55</sub> para a Indução de Diferentes Fenótipos de EAE**

Fenótipo	Dose de MOG <sub>35-55</sub>	Dose de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Dose e Esquema de PTx	Características Clínicas Chave	Referência
Monofásico	200 µg	1-2 mg/mL	400 ng (Dias 0, 2)	Início 9-14 dpi, pico 3-5 dias depois, seguido de recuperação lenta e parcial.	(Bittner et al., 2014)
Crônico Progressivo	200-300 µg	4 mg/mL	200-300 ng (Dias 0, 2)	Início 10-15 dpi, pico severo ~16-18 dpi, sem remissão significativa; défices persistentes.	(Berard et al., 2010; Huntemann et al., 2022)
Remitente-Recorrente	50 µg	0.5-1.0 mg/mL	200 ng (Dias 0, 2)	Episódio inicial seguido de remissões e recidivas clínicas subsequentes.	(Berard et al., 2010)

Legenda: dpi: dias pós-imunização; MOG: glicoproteína da mielina de oligodendróцитos; PTx: toxina pertussis. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

## 2.3 CICLODEXTRINAS (CDs)

As CDs são oligossacarídeos cíclicos de baixo custo e toxicidade que, devido à sua estrutura única em formato de cone, exibem uma notável versatilidade para formar complexos supramoleculares (Di Cagno, 2016; Saokham et al., 2018; Venturini et al., 2008). Sua cavidade central lipofílica é responsável pela sua função mais conhecida na indústria farmacêutica: a formação de complexos de inclusão com moléculas orgânicas (Da Silva Júnior et al., 2019; Lv et al., 2019; Vukic et al., 2020). Paralelamente, sua superfície externa hidrofílica, rica em grupos hidroxila, permite uma forma distinta de interação: a formação de complexos de coordenação do tipo sanduíche com íons metálicos (Khobragade et al., 2024; Prochowicz; Kornowicz; Lewiński, 2017). Essa estrutura é formada quando os grupos hidroxila secundários são desprotonados, permitindo que duas moléculas de CD se conectem por meio de um anel metalomacrocíclico multinuclear (Khobragade et al., 2024; Prochowicz; Kornowicz; Lewiński, 2017). Tal anel é classificado como homometálico ao ser constituído por um único tipo de íon metálico, ou heterometálico se for composto pela combinação de dois ou mais cátions distintos (Prochowicz; Kornowicz; Lewiński, 2017)).

As CDs naturais ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) apresentam respectivamente 6, 7 e 8 anéis de glicose, e embora elas e seus complexos sejam hidrofílicos, apresentam solubilidade limitada em soluções aquosas (Tabela 1) (Di Cagno, 2016; Saokham et al., 2018). Para melhorar a solubilidade, aumentar a capacidade de inclusão ou diminuir a toxicidade das CDs, modificações estruturais são realizadas e novas CDs são sintetizadas, devido a isso, atualmente existem mais de 11.000 derivados de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD (Cid-Samamed et al., 2022; Řezanka, 2019).

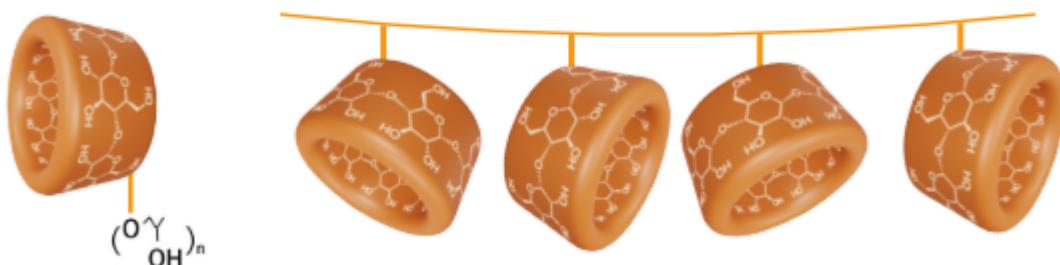
Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas

Ciclodextrina	Abreviação	Radical	PM	Solubilidade (mg/mL, 25 °C)	Diâmetro da cavidade interna (Å)
$\alpha$ -Ciclodextrina	$\alpha$ CD	H	972	145	4,5-5,3
$\beta$ -Ciclodextrina	$\beta$ CD	H	1135	18,5	6,0-6,5
Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	HP $\beta$ CD	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	1400	>1200	6,0
Poli- $\beta$ -ciclodextrina	p $\beta$ CD	$\beta$ CD	-	-	-
$\gamma$ -Ciclodextrina	$\gamma$ CD	H	1297	232	7,5-8,3

Legenda: PM: Peso molecular. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Entre os derivados existentes, podemos destacar o HP $\beta$ CD e o p $\beta$ CD (Figura 3). A HP $\beta$ CD é considerada uma das mais solúveis e mais utilizadas em formas farmacêuticas (Saokham et al., 2018). Já a p $\beta$ CD é formada pela ligação covalente de duas ou mais  $\beta$ CD, permitindo a incorporação de mais moléculas em seu interior (Petitjean; García-Zubiri; Isasi, 2021). Uma vez que a p $\beta$ CD é um polímero com alta polidispersidade, ela não possui uma massa molar definida (Renard et al., 1997). Dessa forma, para permitir o cálculo de estequiométrias de complexação e a comparação direta com outros sistemas, todas as concentrações de p $\beta$ CD são expressas em termos da molaridade das unidades de repetição de  $\beta$ CD. Esta abordagem normaliza a concentração pela unidade funcional, independentemente do peso molecular médio do polímero.

Figura 3 – Estrutura química das ciclodextrinas



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As CDs são consideradas excipientes farmacêuticos facilitadores devido a capacidade de alterar as propriedades físico-químicas de medicamentos e outros compostos, permitindo, por exemplo, aumentar a solubilidade aquosa do fármaco, melhorar a biodisponibilidade, aumentar estabilidade química e física de fármacos, mascara o sabor amargo do ingrediente ativo e melhorar a distribuição do fármaco através de membranas biológicas (Cid-Samamed et al., 2022; Jambhekar; Breen, 2016; Popielec; Loftsson, 2017; Saokham et al., 2018). As CDs conseguem alterar as características físico-químicas de fármacos, pois possuem uma cavidade lipofílica que permite que os fármacos (em sua maioria lipofílicos) se “protejam” do ambiente hidrofílico das soluções aquosas (Cid-Samamed et al., 2022; Popielec; Loftsson, 2017; Saokham et al., 2018).

Para que um fármaco seja “protegido” por uma CD, deve ocorrer um processo de inclusão, que nada mais é do que a formação de um complexo de inclusão, em que uma parte ou toda a estrutura do fármaco se encaixa na cavidade central da CD (Cid-Samamed et al., 2022; Popielec; Loftsson, 2017; Saokham et al., 2018). Esta inclusão não envolve formação ou ruptura de ligações covalentes, apenas interações não covalentes relativamente fracas, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Popielec; Loftsson, 2017).

Vários são os métodos utilizados na complexação de CDs com fármacos, entre eles encontram-se: método de amassamento ou pasta; método de solução ou coprecipitação; método de evaporação de solvente; método de mistura seca; método de mistura úmida e extrusão (Jacob; Nair, 2018). A escolha do método dependerá do tipo de CD utilizada e das características físico-químicas do composto a ser complexado (Jacob; Nair, 2018). A técnica mais empregada em laboratórios de pesquisa é o método de solução ou coprecipitação, seguido pelo método de evaporação de solventes (Jacob; Nair, 2018).

Em relação à toxicologia, sabe-se que a  $\alpha$ CD e a  $\beta$ CD não apresentam efeitos adversos significativos quando administradas por via oral, no entanto, não podem ser administradas por via parenteral devido à sua baixa solubilidade aquosa e nefrotoxicidade (Jambhekar; Breen, 2016). Estudos demonstram que a  $\text{p}\beta\text{CD}$  apresenta uma tendência reduzida de formar agregados com colesterol e um alto grau de biocompatibilidade em análises de sobrevivência com camundongos, sugerindo um menor risco de nefrotoxicidade quando comparada à  $\beta$ CD (Doan; Kojima; Sakurai, 2024). A  $\gamma$ CD apresenta metabolismo semelhante ao do amido e de outras dextrinas lineares, não sendo absorvida intacta pelo trato gastrointestinal e não provocando efeitos adversos (Jambhekar; Breen, 2016). A HP $\beta$ CD demonstrou ser bem tolerada em humanos, sendo o principal efeito adverso o aumento da incidência de fezes moles ou diarreia (Jambhekar; Breen, 2016).

## 2.4 RÓDIO (Rh)

O Rh é um metal de transição, pertencente ao grupo 9 da tabela periódica, com massa atômica de 102,906. Ele apresenta estado sólido à temperatura ambiente e é insolúvel em água, água régia e ácidos (Czerczak et al., 2012; Odularu et al., 2019). O Rh apresenta seis estados de valência, sendo os mais comuns +1 e +3 (PubChem, [S.d.]). O Rh puro é usado principalmente como catalisador para carros (80%), bem como para a fabricação de termopares, instrumentos cirúrgicos, entre outros (Czerczak et al., 2012; PubChem, [S.d.]). Os isótopos  $^{105}\text{Rh}$  e  $^{106}\text{Rh}$  são usados, respectivamente, na radioterapia e na braquiterapia ocular (PubChem, [S.d.]).

Para a síntese de complexos de Rh, normalmente utiliza-se o Rh na forma de cloreto de ródio ( $\text{RhCl}_3$ ). O  $\text{RhCl}_3$  é um pó vermelho-escuro, deliquescente, solúvel em hidróxido alcalino, em soluções de cianeto e em água régia (ChemSpider, [S.d.]; Patnaik, 2003). Dependendo do método de preparação, o  $\text{RhCl}_3$  pode apresentar solubilidade em água (ChemSpider, [S.d.]; Patnaik, 2003).

É importante destacar que diferentes sais de Rh podem apresentar efeitos biológicos distintos. Por exemplo, o hidrato de cloreto de Rh(III) é capaz de inibir a produção de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, GMC-SF, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Iavicoli et al., 2012). A exposição ao  $\text{Na}_3\text{RhCl}_6$  leva a um aumento de IL-10 e não afeta os níveis de IFN- $\gamma$  (Bordignon et al., 2008). E os tratamentos com  $(\text{NH}_4)_2[\text{RhCl}_6]$  e  $\text{RhCl}_3$  inibiram significativamente a liberação de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-5 estimulada pela fitohemaglutinina (Boscolo et al., 2004). O hidrato de cloreto de Rh (III) também apresentou ação nefrotóxica no nível tubular (Iavicoli et al., 2014).

Compostos de Rh são amplamente estudados devido às suas atividades biológicas importantes. Sabe-se que  $\text{RhCl}_3$  possui capacidade antiviral, assim como alguns complexos de Rh possuem atividades biológicas como anticarcinogênica, antimicrobiana e antileishmanicida (Czerczak et al., 2012; Sohrabi et al., 2021). Os complexos de Rh têm grande destaque na química medicinal e na bio-inorgânica, pois são fáceis de sintetizar e possuem baixa afinidade por oxigênio o que permite uma ampla tolerância a grupos funcionais, e estabilidade aquosa (Loreto; Merlino, 2021; Ohata; Ball, 2018; Sohrabi et al.,

2021). Para o uso biológico os complexos de Rh podem ser divididos em (1) complexos  $\text{Rh}^{+3}$ , que são cineticamente inertes e nos quais o Rh desempenha um papel predominantemente estrutural, funcionando como um andaime para os ligantes; (2) complexos  $\text{Rh}^{+2}$ , os quais a troca de ligantes lábeis é um aspecto fundamental da sua função biológica, permitindo a interação com alvos como o DNA; (3) complexos  $\text{Rh}^{+1}$ , que são tipicamente tetracoordenados com uma geometria quadrado-planar reativa, semelhante à da cisplatina, sendo considerados agentes biológicos potentes (Ohata; Ball, 2018; Sohrabi et al., 2021).

Os complexos de  $\text{Rh}^{+3}$  apresentam ação inibitória sobre alvos proteicos, como enzimas (por exemplo, quinases), bem como a modulação de interações proteína-proteína, o que lhes confere um vasto leque de atividades biológicas, incluindo atividades antitumorais, anti-inflamatórias e antibacterianas (Ohata; Ball, 2018; Sohrabi et al., 2021). Já os complexos de  $\text{Rh}^{+2}$  e  $\text{Rh}^{+1}$  apresentam principalmente ação antitumoral e citotóxica ao interagirem diretamente com o DNA (Ohata; Ball, 2018; Sohrabi et al., 2021). Especificamente, os complexos de  $\text{Rh}^{+2}$  também são notáveis pela sua atividade antibacteriana (Bień et al., 1999; Pruchnik; Bień; Lachowicz, 1996), enquanto alguns complexos de  $\text{Rh}^{+1}$  demonstram uma potente e distinta ação antimetastática, inibindo a migração de células cancerígenas (McConnell et al., 2013).

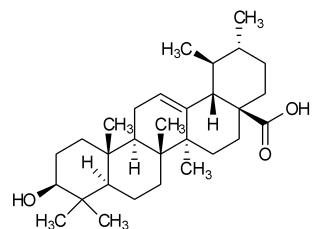
## 2.5 ÁCIDO URSÓLICO (AU)

O AU ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ ; Figura 4) é um triterpeno pentacíclico, com peso molecular de 456,68 g/mol e ponto de ebulição de 283-285 °C (Pironi et al., 2018; Song et al., 2019). O AU pode ser obtido a partir da extração e da purificação de diversas espécies vegetais, entre elas maçãs, mirtilos, orégano, folhas de lavanda, sálvia, alecrim e tomilho, entre outros (Pironi et al., 2018; Song et al., 2019).

Vários estudos têm investigado o potencial farmacológico do AU, que geralmente é administrado por gavagem ou por via intraperitoneal, em doses que variam de 5 a 150 mg/kg (Guo et al., 2021). Entre as atividades biológicas observadas para o AU, pode-se citar: ação anti-inflamatória, hepatoprotetora,

antitumoral, cardioprotetora, neuroprotetora, antimicrobiana, anti-hiperlipidêmica, antidiabética, antifúngica, antiviral e tripanocida (Pironi et al., 2018; Seo et al., 2018).

Figura 4 – Estrutura química do ácido ursólico



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Devido ao seu potencial anti-inflamatório e neuroprotetor, o AU vem sendo testado no tratamento da EM (Guo et al., 2021; Xu et al., 2011; Zhang et al., 2020). Xu e colaboradores (2011) observaram que o AU reduziu a produção de IL-17, ao inibir o fator transcrional ROR- $\gamma$ t, bloqueando assim a diferenciação das células Th17 (Xu et al., 2011). Já Zhang e colaboradores (2020) observaram que o AU induz a expressão do fator neurotrófico ciliar em astrócitos, aumentando, assim, o nível do gene de mielina durante a maturação de oligodendrócitos (Zhang et al., 2020). É importante destacar que os dois estudos foram conduzidos em modelo de EAE utilizando camundongos C57BL/6J imunizados com MOG<sub>35–55</sub>.

Os resultados indicam o AU como um forte candidato como fármaco para o tratamento da EM, no entanto, sua baixa solubilidade e permeabilidade em membranas biológicas dificultam o emprego da substância no tratamento dessa e de outras doenças (Alfei; Schito; Zuccari, 2021; Pironi et al., 2018). Visando ao emprego do AU no tratamento de doenças, vários sistemas de entrega têm sido utilizados com o intuito de melhorar sua solubilidade e permeabilidade, entre eles: nanoemulsões, nanopartículas de sílica mesoporosa, nanopartículas lipídicas sólidas, CDs, lipossomas, géis niossomais e dispersões sólidas (Alfei; Schito; Zuccari, 2021; Pironi et al., 2018).

Na literatura, é possível encontrar trabalhos que apresentam a complexação de AU com  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD e HP $\gamma$ CD (Huang et al., 2017; Inoue et al., 2023; Oprean et al., 2016; Quan et al., 2009; Soica et al., 2014; Song et al., 2019; Zong; Bi, 2012). Entretanto, não são encontrados na literatura trabalhos sobre a complexação do AU com poli-beta-ciclodextrinas (p $\beta$ CD). Os trabalhos que apresentam dados sobre a complexação do AU com CDs demonstram uma melhora na solubilidade do AU em água e, condição que pode favorecer a sua biodisponibilidade..

Em relação à atividade biológica desses complexos, observou-se que o complexo de AU/ $\gamma$ CD apresentou ação hepatoprotetora, porém manteve o mesmo efeito do AU isolado (Žaloudková et al., 2020). Testes com os complexos AU/ $\beta$ CD, AU/HP $\beta$ CD e AU/HP $\gamma$ CD demonstraram que esses apresentam maior atividade antitumoral *in vitro* do que o AU isolado (Oprean et al., 2016; Soica et al., 2014; Song et al., 2019). Não foram encontrados estudos que avaliem a ação dos complexos de AU complexados com CDs no tratamento da EM.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito imunomodulador de Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

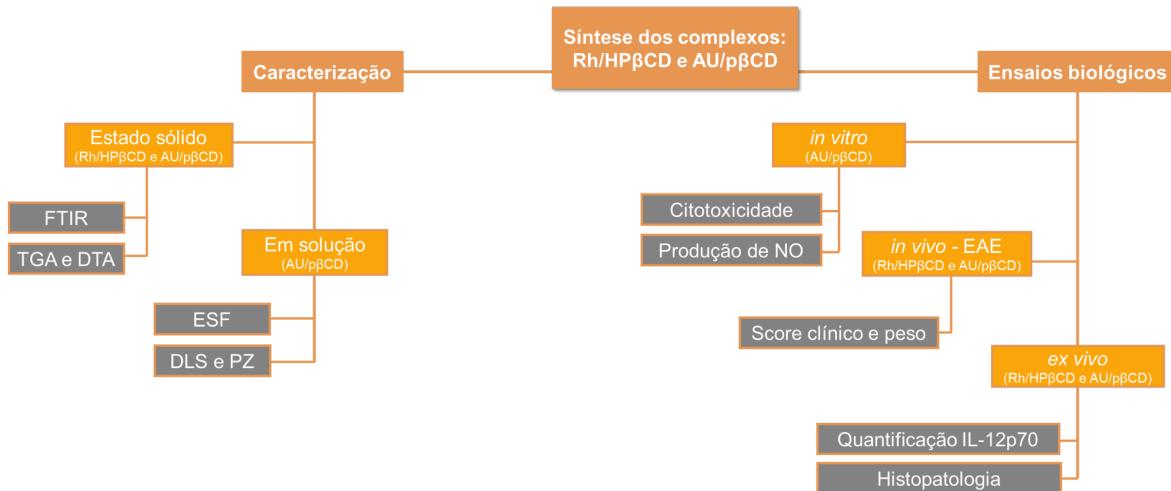
- Sintetizar os complexos de inclusão Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD;
- Caracterizar estrutural e físico-quimicamente Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade do AU/p $\beta$ CD em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1;
- Quantificar *in vitro* a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com AU/p $\beta$ CD;
- Avaliar o impacto de Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD na progressão da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE);
- Quantificar a produção da citocina pró-inflamatória IL-12p70 em macerados de cérebro e medula espinhal de camundongos com EAE tratados com Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD;
- Realizar análise histopatológica do infiltrado inflamatório e da desmielinização do cérebro e da medula espinhal de camundongos com EAE tratados com Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 5 ilustra o delineamento experimental deste estudo, que se inicia com a síntese dos complexos de Rh/HP $\beta$ CD e de AU/p $\beta$ CD, seguida da caracterização físico-química e da avaliação da atividade biológica destes. A caracterização físico-química dos complexos foi conduzida de forma estratégica, considerando o estágio de conhecimento de cada um. O Rh/HP $\beta$ CD, sintetizado em continuidade ao trabalho de Carvalho et al. (2025), teve sua formação confirmada por espectroscopia FTIR e por análises térmicas (TGA/DTA). Por outro lado, o AU/p $\beta$ CD inédito na literatura foi caracterizado mais aprofundadamente para determinar seu comportamento supramolecular. Além dos testes de FTIR e TGA/DTA, a interação foi quantificada por meio do experimento de solubilidade de fase (ESF), assim como, dos teste de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e potencial zeta (PZ).

Figura 5 – Fluxograma do delineamento experimental.



Legenda: FTIR: espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier; TGA: análise térmica termogravimétrica; DTA: análise térmica diferencial; ESF: experimento de solubilidade de fase; DLS: espalhamento de luz dinâmico; PZ: potencial zeta; NO: óxido nítrico; EAE: encefalomielite autoimune experimental. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A avaliação da atividade biológica também foi dividida. Para o Rh/HP $\beta$ CD, foram realizados exclusivamente testes *in vivo* em modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), seguidos de análises de dosagem de citocinas e de histopatologia do cérebro e da medula espinhal. É importante ressaltar que os testes *in vitro* de citotoxicidade e de quantificação de óxido nítrico (NO) para este complexo foram realizados e publicados anteriormente por Carvalho et al. (2025). Para o AU/p $\beta$ CD, inédito, a avaliação biológica incluiu testes *in vitro* e *in vivo* no mesmo modelo de EAE, com as mesmas análises pós-tratamento.

## 4.2 SÍNTSE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

### 4.2.1 Químicos e reagentes

A HP $\beta$ CD foi adquirida da Cerestar (Hammond, IN, EUA). Os seguintes reagentes foram utilizados e adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) ou da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil): AU, RhCl<sub>3</sub>, brometo de potássio (KBr), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT), meio RPMI-1640, reagente de Griess, lipopolissacarídeo (LPS), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), albumina sérica bovina (BSA), L-glutamina, antibiótico estreptomicina-penicilina, soro fetal bovino, ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), fluoreto de fenilmetsulfonila (PMSF), nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As linhagens celulares utilizadas no estudo foram os macrófagos murinos RAW 264.7 (cedidos pelo Imunocet/UFJF) e J774A.1 (adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ). O kit para quantificação da citocina IL-12p70 foi adquirido de BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). O tampão de extração de citocinas foi preparado com 0,4 M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 M de PMSF e 0,1 M de cloreto de benzetônio (BC). Para a indução da EAE, foram utilizados o peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (GenOne, Campinas, SP, Brasil), o adjuvante completo de Freund, a toxina pertussis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI, EUA). Para eutanásia, os anestésicos cetamina e

xilazina foram adquiridos, respectivamente, da Sintec e da Calmiun, Agener União.

#### **4.2.2 Síntese da p $\beta$ CD**

A p $\beta$ CD foi sintetizada por meio de uma reação de polimerização de  $\beta$ CD utilizando epicloridrina como reticulador químico em meio básico ( $\text{NaOH}$  5 mol L $^{-1}$ ). A reação foi realizada em um reômetro dinâmico híbrido DHR1, que serviu como reator, sob agitação controlada (1000 s $^{-1}$ ) e a temperatura de 40 °C. Após a síntese, a p $\beta$ CD foi purificada por precipitação com acetona. O sólido resultante foi seco, redissolvido em água, neutralizado com HCl até pH 7 e reprecipitado em acetona (Renard et al., 1997).

#### **4.2.3 Síntese dos complexos**

O Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD foram preparados pela técnica de coprecipitação por agitação mecânica, utilizando a proporção molar de 1:1 entre a substância hóspede (Rh e AU) e as CDs. Para a síntese, foram preparadas soluções aquosas e/ou metanólicas a 5 mM de  $\text{RhCl}_3$  hexahidratado e do AU, bem como das respectivas CDs (HP $\beta$ CD e P $\beta$ CD). Um volume de 20 mL de cada solução foi homogeneizado e mantido sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas para permitir a formação dos complexos de inclusão. Após a agitação, as soluções foram submetidas à etapa de remoção do solvente. No caso da solução metanólica, o solvente foi removido por rotaevaporação. Em seguida, os materiais foram congelados e, posteriormente, submetidos à liofilização por 5 dias para a obtenção dos complexos na forma de pó. Após a liofilização, os complexos foram armazenados a -4 °C até o momento das análises.

As misturas mecânicas (MMs), utilizadas como controle para a caracterização, foram preparadas pela homogeneização dos componentes puros ( $\text{RhCl}_3$  hexahidratado, AU e CDs) na proporção molar de 1:1. As substâncias foram pesadas e, em seguida, maceradas em grau de porcelana com auxílio de

pistilo. O material foi acondicionado em microtubos e armazenado a -4 °C até o momento das análises.

#### **4.2.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

As análises de FTIR em estado sólido foram obtidas no espectrômetro Spectrum Two™ (PerkinElmer) com pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos como a média de 8 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e intervalo de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram obtidos pelo software Spectrum ES (PerkinElmer, versão 10.03.08.0133).

#### **4.2.5 Análise de termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)**

As análises térmicas foram realizadas no módulo termoanalítico STA7200RV (Hitachi), com rampa de temperatura de 30 °C a 900 °C e taxa de aquecimento de 10 °C/min. Cerca de 5 mg das amostras foram analisadas em cadinho de platina, sendo utilizado um cadinho vazio como controle (Carvalho et al., 2025).

#### **4.2.6 Análise de solubilidade de fase (SF)**

Foram preparadas soluções aquosas de pβCD em concentrações variando de 0 a 12,3 mmol L<sup>-1</sup> (tabela 2). Em cada solução (3 mL), adicionou-se 1 mg de AU. As amostras foram mantidas sob agitação a 30°C por 48 horas em agitador térmico, e posteriormente filtradas com membrana de 0,45 µm. As análises de concentração foram realizadas por espectrofotometria UV-Vis ( $\lambda = 210$  nm), utilizando o equipamento Lambda 25 (PerkinElmer) (Inoue et al., 2023).

Tabela 2 - Concentrações de pβCD utilizadas no experimento de solubilidade de fase.

Tubo	Concentração (mmol · L <sup>-1</sup> )	Tubo	Concentração (mmol · L <sup>-1</sup> )
1	0,00	9	7,05
2	0,88	10	7,93
3	1,76	11	8,81
4	2,64	12	9,69
5	3,52	13	10,57
6	4,41	14	11,45
7	5,29	15	12,33
8	6,17		

Legenda: pβCD: poli-β-ciclodextrina. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A partir dos dados de solubilidade, foram construídos diagramas de solubilidade de fase, em que se plotou a concentração total de AU em função da concentração de pβCD. A constante de estabilidade aparente ( $K_{1:1}$ ) foi determinada segundo o modelo de Higuchi e Connors (1965), aplicável a complexos estequiométricos 1:1, conforme a equação 1:

$$K_{1:1} = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1-\text{inclinação})} \quad (1)$$

A eficiência de complexação (CE) foi calculada pela equação 2:

$$\text{CE} = \frac{\text{inclinação}}{1-\text{slope}} = K_{1:1} \times S_0 \quad (2)$$

onde  $S_0$  é a solubilidade intrínseca do AU.

O aumento percentual na solubilidade aparente do AU por milimol de pβCD (AS) foi obtido conforme a equação 3:

$$\text{AS} = \frac{A\text{U}_{\text{max}} - [A\text{U}_{S0}]}{A\text{U}_{S0} \times [CD_{\text{max}}]} \times 100 \quad (3)$$

onde  $AU_{max}$  é a maior solubilidade observada do AU na presença de HP $\beta$ CD,  $AUS_0$  é a solubilidade do AU livre, e  $[CD_{max}]$  corresponde à concentração máxima de p $\beta$ CD na fase líquida em equilíbrio.

#### **4.2.7 Análise de fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ)**

Para a realização dos experimentos de DLS e PZ, foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com termostatização Peltier. Foram preparadas soluções de AU e de AU/p $\beta$ CD em DMSO, na concentração de 30 mM.

Para os experimentos foram realizadas 25 injeções de 20  $\mu\text{L}$  das amostras em 1,5 mL de água. Para o experimento de DLS as amostras foram inseridas em cubetas de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada e medida a  $90^{\circ}$ . O diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. Já para o experimento de PZ as soluções foram adicionadas a uma cubeta de polietileno, imersa à célula de medida (Dip Cell) e avaliada por técnica de micro-eletroforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a  $173^{\circ}$  e DDP alternada a 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculados pelo modelo de Smoluchowski. O valor final do PZ foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 10 contagens cada.

### **4.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPLEXOS**

#### **4.3.1 Análises *in vitro* - macrófagos J774.A1 e RAW 264.7**

Para conferir maior robustez aos dados farmacológicos e validar a consistência da resposta biológica frente a diferentes perfis genéticos e fenotípicos, foram empregadas duas linhagens distintas de macrófagos murinos:

J774A.1 e RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado (2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e penicilina, e 5% de soro fetal bovino), sob atmosfera umidificada a 37 °C com de 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem a confluência, as células foram quantificadas e semeadas em placas de 96 poços a 2 x 10<sup>5</sup> células/poço.

As culturas foram então tratadas por 48 horas com pβCD, AU e AU/pβCD nas concentrações de 15, 30 e 60 µM, em triplicata. Para o preparo dos tratamentos, os compostos foram solubilizados em um veículo composto por PBS e DMSO na proporção de 80:20 (v/v). A fim de excluir qualquer interferência ou toxicidade do solvente, o veículo (PBS:DMSO) foi testado isoladamente em volumes equivalentes a todas as diluições utilizadas nos grupos tratados.

Para a análise de produção de NO, as células foram estimuladas com 10 µg/mL de LPS e 9 ng/mL de IFN-γ. Foram usadas células estimuladas sem tratamento como controle positivo e células não estimuladas nem tratadas como controle negativo. O Rh/HPβCD não foi testado *in vitro*, considerando que estes resultados já foram obtidos em trabalho previamente realizado pelo grupo (Carvalho et al., 2025).

#### 4.3.1.1 Análise de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT, conforme descrito por (Carvalho et al., 2025). Após 48 horas de incubação das células com os tratamentos e seus respectivos controles de veículo em triplicata, os sobrenadantes foram removidos dos poços e descartados, sendo em seguida adicionados 100 µL de RPMI-1640 e 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço. Após 4 horas de incubação, o meio com MTT foi removido e substituído por 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan, se presentes. A absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer) (Castro et al., 2012). Foram realizados três experimentos independentes.

#### 4.3.1.2 Análise de NO pelo método de Griess

A concentração de NO foi estimada indiretamente por meio da quantificação de nitrito pelo método de Griess, conforme descrito por Carvalho et al. (2025). Após 48 h de incubação com os respectivos tratamentos e seus respectivos controles de veículo, conforme descrito em 4.3.1, 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para nova placa e foram adicionados 100 µL do reagente de Griess. A concentração de nitrito foi determinada por meio de curva padrão de NaNO<sub>2</sub>, com leitura da absorbância a 540 nm. A porcentagem de produção de NO foi calculada considerando o controle de produção, células não tratadas e células estimuladas com LPS e IFN-γ (Castro et al., 2012). Foram realizados três experimentos independentes.

#### 4.3.2 Análise *in vivo* – encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com 6-8 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Teófilo Otoni/MG), em estantes ventiladas, em sala com temperatura e umidade controladas, e com dieta *ad libitum*, em conformidade com o Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Estes experimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFVJM – CEUA/Mucuri (nº 03-2021 e 03-2023 – Anexo I).

##### 4.3.2.1 Indução da EAE

Para a indução do modelo de EAE em sua forma crônica progressiva, seguiu-se o protocolo descrito por Ramos et al. (2024). Cada animal induzido foi imunizado por via subcutânea (s.c.) com 100 µL, em cada lado da região dorsal

próxima à base da cauda, contendo 100 µg de MOG<sub>35-55</sub> emulsificado em adjuvante completo de Freund, na proporção 1:1, suplementado com 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* — cepa H37RA. No dia da imunização e 48 horas após, cada animal recebeu 0,3 µg de toxina pertussis por via intraperitoneal (i.p.). Ao 21º dpi, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e exsanguinação, com a administração de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (100 mg/Kg, i.p.). Amostras de cérebro e medula espinhal foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análises subsequentes.

#### 4.3.2.2 Avaliações clínicas e tratamentos

A massa corporal foi registrada diariamente a partir do dia zero, enquanto a avaliação do escore de incapacidade neurológica (EIN) teve início no 8º dia após a imunização (dpi). Todas as análises ocorreram no período da manhã. O EIN foi determinado por meio de pontuação individual de determinadas regiões do corpo dos camundongos, de acordo com a escala apresentada no Quadro 3 (De Paula et al., 2008), sendo realizado pelo mesmo pesquisador para minimizar a variabilidade interobservador. Em caso de óbito, o camundongo recebeu o valor máximo da escala. O escore final foi obtido somando-se os pontos individuais de cada animal.

O tratamento foi iniciado no 14º dpi, consistindo em administrações intraperitoneais (i.p.) diárias, realizadas sempre após a avaliação do EIN. Onde os animais foram distribuídos em 8 grupos (n=12/14 camundongos por grupo). O Grupo 1 (controle negativo - CN) foi composto por animais não imunizados que não receberam tratamento. Os Grupos 2, 3 e 4 foram compostos por animais imunizados, sendo tratados, respectivamente, com 5 mg/Kg de RH, HPβCD e Rh/HPβCD. Os Grupos 5, 6 e 7 foram compostos por animais imunizados, sendo tratados, respectivamente, com 50 mg/Kg de AU, pβCD e AU/pβCD. O Grupo 8 (controle positivo - CP) foi composto por animais imunizados que não receberam tratamento. Para as injeções, as formulações dos grupos 2, 3 e 4 foram solubilizadas em PBS, enquanto as dos grupos 5, 6 e 7 utilizaram uma mistura de PBS e DMSO (80:20 v/v). As doses foram escolhidas com base em estudos

prévios que demonstraram sua eficácia e segurança em modelos experimentais *in vivo* (Carvalho et al., 2025; Scherrer et al., 2023).

**Quadro 3 - Escala de incapacidade neurológica (EIN) para avaliação da EAE**

Parte do animal	Score	Características
<b>Cauda</b>	<b>0</b>	Um camundongo normal mantém a cauda ereta enquanto se move.
	<b>1</b>	Se a extremidade da cauda está flácida, com tendência a cair.
	<b>2</b>	Se a cauda está completamente flácida e se arrasta na superfície.
<b>Membros inferiores</b>	<b>0</b>	Um camundongo normal tem uma marcha enérgica e não arrasta as patas.
	<b>1</b>	Um dos dois testes a seguir é positivo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste da virada: enquanto mantém a cauda entre o polegar e o indicador, vire o animal de barriga para cima e observe o tempo que ele leva para acertar a postura. Um camundongo saudável se vira imediatamente. Uma demora sugere fraqueza nas patas traseiras.</li> <li>• Posicionar o camundongo na parte externa da gaiola e observar sua movimentação à medida que ele atravessa de uma extremidade à outra da gaiola. Se uma ou ambas as patas traseiras frequentemente atravessaram as barras da gaiola, consideramos que há paralisia parcial.</li> </ul>
	<b>2</b>	Ambos os testes posteriores são positivos.
	<b>3</b>	Uma ou ambas as patas traseiras mostram sinais de paralisia, mas algum movimento é preservado, por exemplo: o animal pode agarrar e se manter na parte interna da gaiola por um curto momento antes de soltar.
	<b>4</b>	Quando ambas as patas traseiras estão paralisadas, o camundongo as arrasta enquanto se move.
	<b>0</b>	Um camundongo normal usa suas patas dianteiras para se agarrar e andar e mantém sua cabeça ereta.
	<b>1</b>	Andar é possível, mas difícil, devido à fraqueza em uma ou ambas as patas: por exemplo, as patas dianteiras são consideradas fracas quando o camundongo tem dificuldade em agarrar-se à parte interior da gaiola. Outro sinal de fraqueza é a falta de tônus no pescoço.
<b>Patas dianteiras</b>	<b>2</b>	Quando uma parte dianteira está paralisada (impossibilidade de agarrar), o camundongo fica dando voltas em torno da pata paralisada. Nesse momento, o pescoço já perdeu grande parte do seu tônus muscular.
	<b>3</b>	O camundongo não pode se mover e não consegue beber água ou se alimentar.
	<b>0</b>	Um camundongo normal tem controle total sobre a bexiga.
<b>Bexiga</b>	<b>1</b>	Um camundongo é considerado incontinente quando a porção posterior de seu corpo está encharcada de urina.

Fonte: Elaborado por De Paula (2008).

#### 4.3.3 Dosagem de citocina IL-12p70

A citocina IL-12p70 foi quantificada por ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de cérebro e medula espinhal de camundongos imunizados para

EAE. Para a preparação das amostras, os tecidos foram pesados e macerados em tampão de extração de citocinas a 100 mg/kg. Em seguida, o homogeneizado foi submetido à centrifugação a 10.000 RPM por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento da análise. A quantificação da citocina foi realizada com um kit comercial de ELISA, seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences® ou R&D Systems®).

#### **4.3.4 Histopatologia**

Os animais eutanasiados foram perfundidos com formalina tamponada 10%. Em seguida, a medula espinhal e o cérebro foram removidos e fixados também em formalina tamponada 10%. Após a inclusão, foram realizados cortes transversais de 5 µm, submetidos à coloração em Hematoxilina–Eosina (H&E) e em Luxol Fast Blue (LFB) (Steinbach; Merkler, 2016).

A coloração com H&E incluiu desparafinização com xanol, reidratação com sucessivos banhos de álcool, coloração com hematoxilina (2 min) e eosina (1 min) e desidratação. Já para o LFB, as lâminas passaram por desparafinização com xanol, reidratação com sucessivos banhos de álcool, imersão no corante LFB durante a noite a 56°C, seguida da retirada do excesso de corante com álcool 95%, diferenciação com solução de carbonato de lítio e etanol 70%, e coloração final com cresil violeta (6 min).

As imagens foram capturadas em ampliações de 100x e 400x, e a avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório e da desmielinização foi realizada de forma cega por um patologista, considerando-se três campos por seção. O grau de inflamação e desmielinização foi pontuado em uma escala de 0 a 5, em que 0 representa ausência e 5 indica acentuada participação tecidual (>50%), conforme descrito (Pant et al., 2017).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida com os softwares Microcal Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) e GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os dados de caracterização físico-química (DLS, PZ e SF) foram obtidos em triplicata técnica e expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises de interações físico-químicas por FTIR, TGA e DTA foram realizadas por meio de inspeção comparativa, considerando a sobreposição de perfis e o deslocamento de sinais característicos como critérios para a identificação de possíveis interações moleculares.

Os dados biológicos foram obtidos em, no mínimo, dois experimentos independentes, realizados em triplicata, e apresentados conforme a natureza da variável. Para os conjuntos de dados com distribuição paramétrica, os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), ao passo que os dados não paramétricos (escores de inflamação e escores de desmielinização) foram representados em gráficos do tipo boxplot, contendo mediana, quartis, valores mínimos e máximos, além dos pontos individuais sobrepostos, de modo a evidenciar a dispersão real das observações.

A verificação da normalidade da distribuição dos dados foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

- Variáveis paramétricas: para a análise dos dados provenientes de ensaios de viabilidade celular, produção de óxido nítrico (NO) e quantificação de IL-12p70, empregou-se o teste ANOVA de uma via, seguido do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos experimentais.

- Variáveis não paramétricas: para os escores semiquantitativos de inflamação e desmielinização, a análise entre grupos foi conduzida pelo teste de Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas post-hoc foram realizadas controlando a Taxa de Falsa Descoberta (FDR) pelo método original de Benjamini-Hochberg.

• Medidas repetidas: a análise da progressão da doença e da eficácia dos tratamentos ao longo do tempo (experimentos de evolução clínica da EAE e de acompanhamento da massa corporal) foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas. As comparações múltiplas seguiram um fluxo hierárquico em duas etapas:

1. Análise de eficácia: todos os grupos experimentais e o grupo CN foram comparados diretamente ao grupo CP pelo teste post-hoc de Dunnett, considerando eficazes apenas os tratamentos que apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle Positivo.

2. Análise comparativa entre tratamentos eficazes: em seguida, foi conduzido um novo ANOVA de duas vias, restrito ao subconjunto de dados contendo apenas o grupo Controle Negativo e os grupos de tratamento previamente classificados como eficazes. As comparações múltiplas entre esses grupos foram realizadas pelo teste post-hoc de Tukey, permitindo identificar diferenças na magnitude do efeito entre os tratamentos em cada ponto de tempo avaliado.

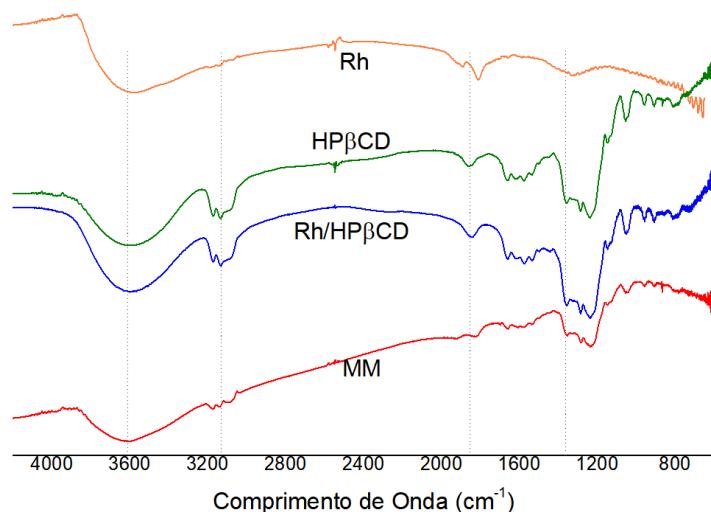
## 5.RESULTADOS

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

#### 5.1.1 FTIR

O espectro da HP $\beta$ CD (Figura 6) está de acordo com os dados da literatura, apresentando bandas de absorção em 3415 cm $^{-1}$ , 2932 cm $^{-1}$ , 1647 cm $^{-1}$  e 1155 cm $^{-1}$ , correspondentes ao estiramento -OH, estiramento -CH, vibração -C=O e à vibração de estiramento -CO, respectivamente (Da Silva Júnior et al., 2019; Goswami; Sarkar, 2018; Shen et al., 2022). O espectro do Rh apresenta bandas em 3418 cm $^{-1}$ , 1697 cm $^{-1}$  e 1607 cm $^{-1}$  atribuídas ao estiramento e à deformação de O-H das moléculas de água de hidratação (Carvalho et al., 2025). Em comparação com os precursores, a MM e o Rh/HP $\beta$ CD apresentaram mudanças nas posições e intensidades das principais bandas da HP $\beta$ CD (Tabela 3).

Figura 6 - Espectros de FTIR do Rh, do HP $\beta$ CD, do Rh/HP $\beta$ CD e do MM na região de 4000 a 400 cm $^{-1}$  em KBr.



Legenda: — Rh: cloreto de ródio; — HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodexrina; — Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodexrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 3 - Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho do Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.

Composto	$\nu$ (OH) / cm $^{-1}$	$\nu$ (CH, CH $_2$ , CH $_3$ ) / cm $^{-1}$	$\nu$ (CO, hidratação) / cm $^{-1}$	$\nu$ (anel piranose) / cm $^{-1}$
Rh	3418	-	1697, 1607	-
HP $\beta$ CD	3418	2975, 2937, 2872	1652, -	1157
Rh/HP $\beta$ CD	3406	2982, 2930, 2872	1639, -	1157
MM	3425	2975, 2934, 2872	1697, 1607	1157

Legenda: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; MM: mistura mecânica;  $\nu$ : número de onda. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

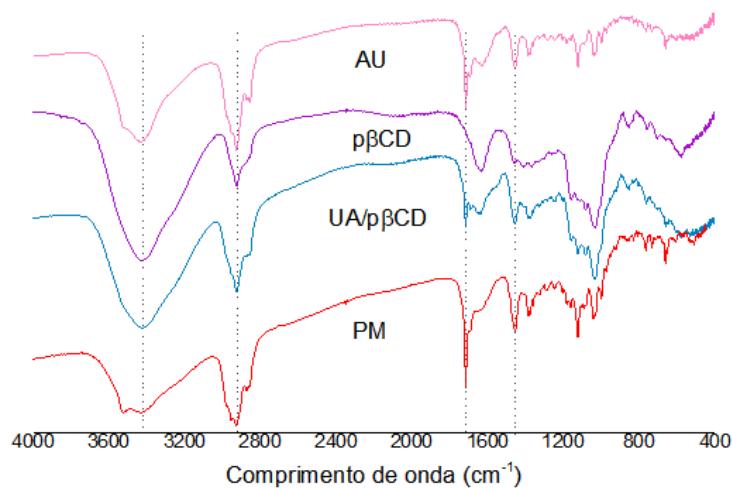
Para o segundo sistema, a p $\beta$ CD (Figura 7) apresentou espectro característico, com bandas em 3427 cm $^{-1}$ , 2933 cm $^{-1}$ , 1636 cm $^{-1}$  e 1036 cm $^{-1}$ , associadas ao estiramento O-H, estiramento C-H, vibração C-O e vibração envolvendo a ligação  $\alpha$ -1,4, respectivamente (Pratt et al., 2010; Zhong et al., 2020). Enquanto o AU apresentou bandas em 3432 cm $^{-1}$ , 2921 cm $^{-1}$ , 2854 cm $^{-1}$  e 1716 cm $^{-1}$ , que correspondem respectivamente ao estiramento O-H, sobreposições de estiramento C-H, C-H $_2$  e C-H $_3$ , estiramento de -CH de metíleno e estiramento de C=O (Pratt et al., 2010; Yang et al., 2012; Zong; Bi, 2012). Em comparação com os precursores, a MM e o AU/p $\beta$ CD apresentaram alterações nas posições e intensidades das principais bandas da p $\beta$ CD (Tabela 4).

Tabela 4 - Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.

Compostos	$\nu$ (OH) / cm $^{-1}$	$\nu$ (CH, CH $_2$ , CH $_3$ ) / cm $^{-1}$	$\nu$ (C=O) / cm $^{-1}$	$\nu$ (C-O) / cm $^{-1}$	$\nu$ ( $\alpha$ -1,4) / cm $^{-1}$
AU	3432	2921, 2854	1716	1625*	1036*
p $\beta$ CD	3427	2933, 2858	-	1636	1036
AU/P $\beta$ CD	3437	2923, 2853	1716	1641	1030
MM	3432	2928, 2862	1716	1625	1041

Legenda: \* = o pico relatado não se refere à vibração indicada na tabela, mas se encontra na mesma posição. AU = ácido ursólico, p $\beta$ CD = poli- $\beta$ -ciclodextrina, MM = mistura mecânica, AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina;  $\nu$ : número de onda. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 7 - Espectros de FTIR do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM na região de 4000 a 400 cm $^{-1}$  em KBr.



Legenda: — AU: ácido ursólico; — p $\beta$ CD: poli-beta-ciclodextrina; — AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli-beta-ciclodextrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

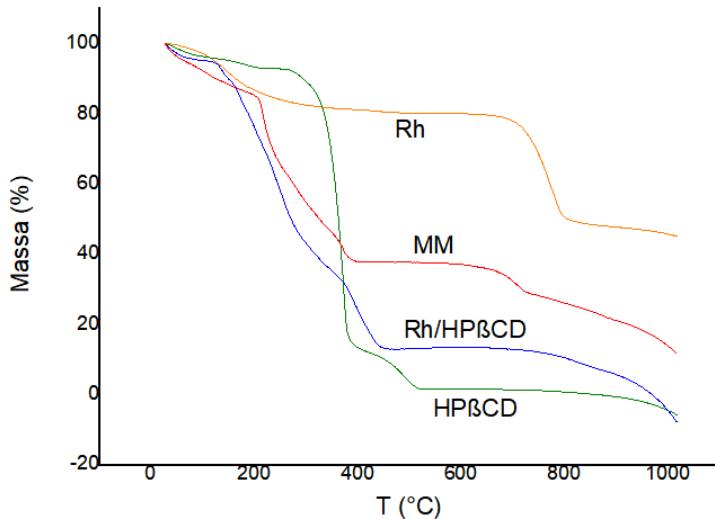
### 5.1.2 TGA e DTA

A HP $\beta$ CD apresenta duas etapas de perda de massa (%): uma abaixo de 200 °C (75%) e outra em torno de 350 °C (~91%), associadas, respectivamente, à liberação de moléculas de água das cavidades e da superfície da CD, e à rápida degradação da HP $\beta$ CD, seguida de sua carbonização (Truzzi et al., 2021) (Figura 8). Os perfis térmicos do Rh/HP $\beta$ CD e da MM diferiram do da HP $\beta$ CD isolada, com variações nas temperaturas e nas intensidades dos eventos de degradação.

Já a p $\beta$ CD apresenta três etapas de perda de massa (%): uma abaixo de 230 °C (3%), uma na faixa de 230 a 523 °C (60%) e a última na faixa de 525 a 1000 °C (15%), associadas, respectivamente, à perda de água, à decomposição da estrutura polimérica e à carbonização e degradação dos resíduos carbonáceos (Figura 9). Para o AU foram observadas quatro etapas de perda de massa (%): uma abaixo de 250 °C (2%), uma em torno de 330 °C (66%), uma na faixa de 370 e 515 °C (10%) e a última na faixa de 515 e 1000 °C (17%), sendo a primeira associada à perda de moléculas de água, e as demais associadas à degradação

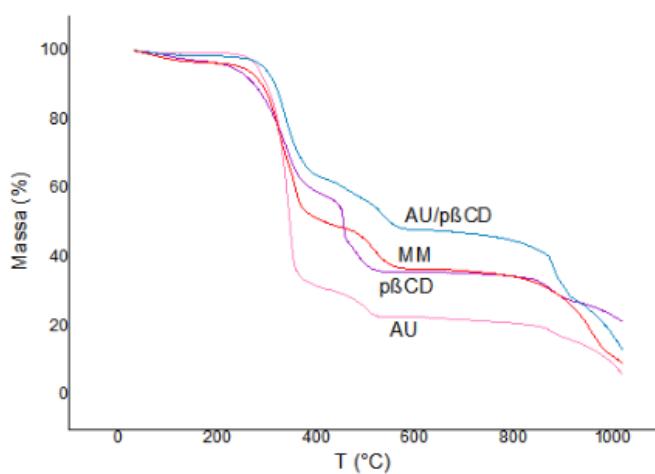
e decomposição da estrutura. O perfil térmico do AU/p $\beta$ CD difere dos perfis do AU e do p $\beta$ CD, com variações na temperatura e na intensidade dos eventos de degradação. Enquanto a MM praticamente se sobrepõe ao termograma da p $\beta$ CD.

Figura 8 - Termogramas de TGA de Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.



Legenda: — Rh: cloreto de ródio; — HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; — Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 9 - Termogramas de TGA do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.



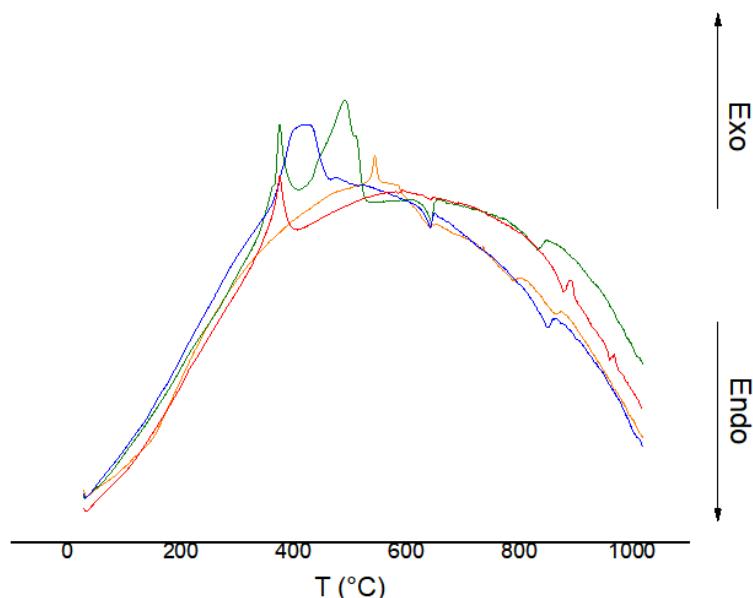
Legenda: — AU: ácido ursólico; — p $\beta$ CD: poli-beta-ciclodextrina; — AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli-beta-ciclodextrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Na DTA, o Rh apresentou um evento exotérmico ( $T_{\text{máx}}$  de 542 °C) atribuído à sua decomposição (Figura 10). A HP $\beta$ CD exibiu dois eventos exotérmicos ( $T_{\text{máx}}$

de 375 °C e 490 °C) relacionados respectivamente a sua degradação e à carbonização. O Rh/HP $\beta$ CD apresentou um evento exotérmico mais amplo ( $T_{\text{máx}}$  de 369-459 °C), atribuído à sua decomposição e fusão, enquanto a MM apresentou um único pico exotérmico ( $T_{\text{máx}}$  de 373 °C) atribuído à sua decomposição.

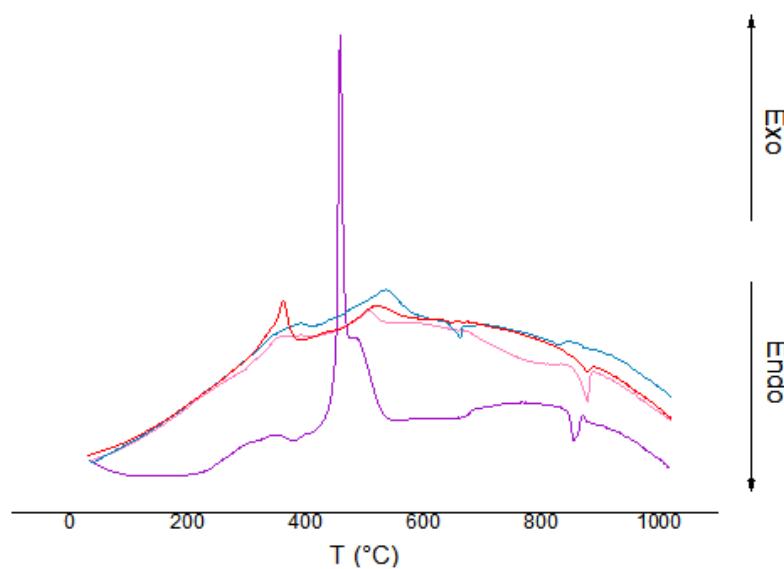
Para o AU, observaram-se dois eventos exotérmicos ( $T_{\text{máx}}$  de 353 °C e 504 °C), atribuídos à decomposição do AU. A p $\beta$ CD apresentou dois eventos exotérmicos ( $T_{\text{máx}}$  de 328 °C e 458 °C), relacionados respectivamente a sua degradação e carbonização (Figura 11). O AU/p $\beta$ CD apresentou um único evento ( $T_{\text{máx}}$  de 538 °C), atribuído à decomposição e à fusão de AU/p $\beta$ CD, enquanto a MM apresentou dois picos ( $T_{\text{máx}}$  de 362 °C e 523 °C), atribuídos à decomposição da MM.

Figura 10 - Termogramas de DTA do Rh, HP $\beta$ CD, Rh/HP $\beta$ CD e MM.



Legenda: — Rh: cloreto de ródio; — HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; — Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 11 - Termogramas de DTA do AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD e MM.

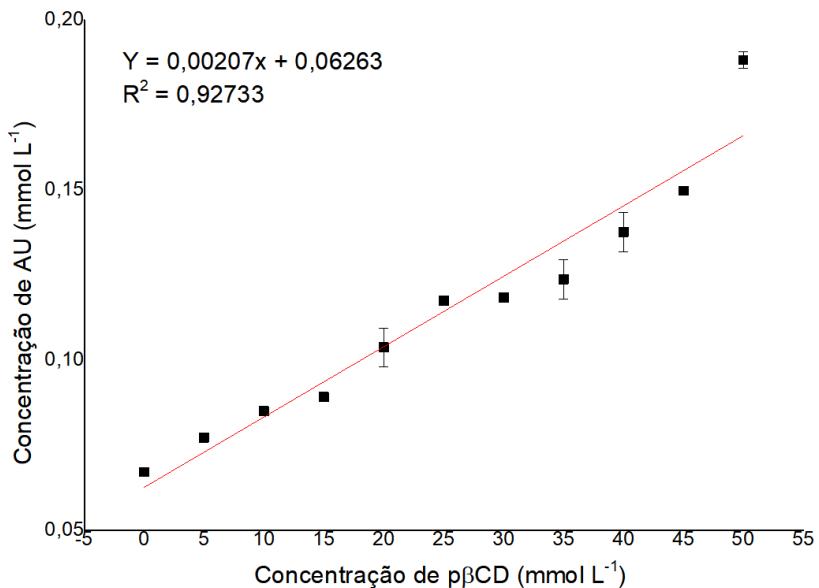


Legenda: — AU: ácido ursólico; — p $\beta$ CD: poli-beta-ciclodextrina; — AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli-beta-ciclodextrina; — MM: mistura mecânica. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

### 5.1.3 SF

O perfil de solubilidade de fase do AU com p $\beta$ CD mostrou-se linear na faixa de concentrações de 0 a 12,3 mM, classificando-se como do tipo A<sub>L</sub>, indicando a formação de um complexo 1:1 (fármaco:CD), conforme o modelo de Higuchi e Connors (Figura 12). A partir da equação da reta obtida, foi calculada a K<sub>1:1</sub> do AU/p $\beta$ CD, cujo valor foi de 33,12 M<sup>-1</sup>. A CE foi determinada em  $2,075 \times 10^{-3}$ . Além disso, o AS foi de 3,31%, com base na diferença entre a AU<sub>max</sub> (0,08809 mM) e sua AU<sub>S0</sub> (0,06263 mM), na presença de 12,3 mM de HP $\beta$ CD.

Figura 12 – Diagrama de solubilidade de fase do AU em função da p $\beta$ CD



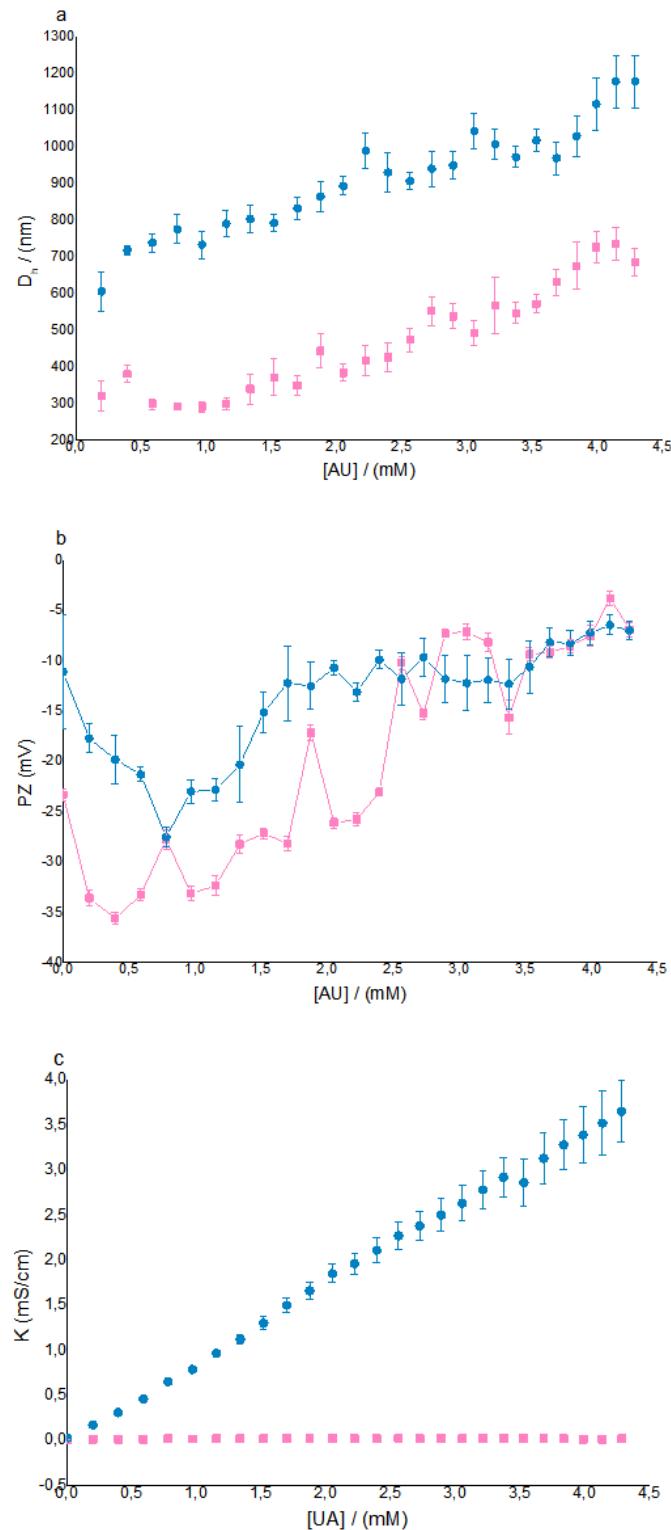
Legenda: — AU: ácido ursólico; — p $\beta$ CD: poli-beta-ciclodextrina. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 5.1.4 DLS e PZ

O Dh das partículas de AU/p $\beta$ CD foi consistentemente superior ao das partículas de AU em toda a faixa de concentração (Figura 13a). Enquanto o AU puro apresentou um Dh na faixa de 350-800 nm, o AU/p $\beta$ CD exibiu valores que se iniciaram em aproximadamente 700 nm, ultrapassando 1100 nm na maior concentração. Para ambos os sistemas, observou-se uma tendência de aumento do tamanho à medida que a concentração aumentava.

As medições de PZ (Figura 13b) mostraram que ambas as amostras apresentaram carga de superfície negativa. Os valores de PZ do AU livre (variando de -35 mV a -15 mV) foram mais negativos do que os do AU/p $\beta$ CD (variando de -22 mV a -5 mV). Em ambos os casos, o PZ tornou-se menos negativo à medida que aumentava a concentração. A análise de condutividade elétrica (Figura 13c) mostrou que a solução de AU livre apresentou condutividade próxima de zero em todas as concentrações. Em contraste, a condutividade da solução do AU/p $\beta$ CD aumentou de forma linear com a concentração, atingindo um valor superior a 3,5 mS/cm.

Figura 13 – Valores de Dh, PZ e K do AU e do AU/p $\beta$ CD.



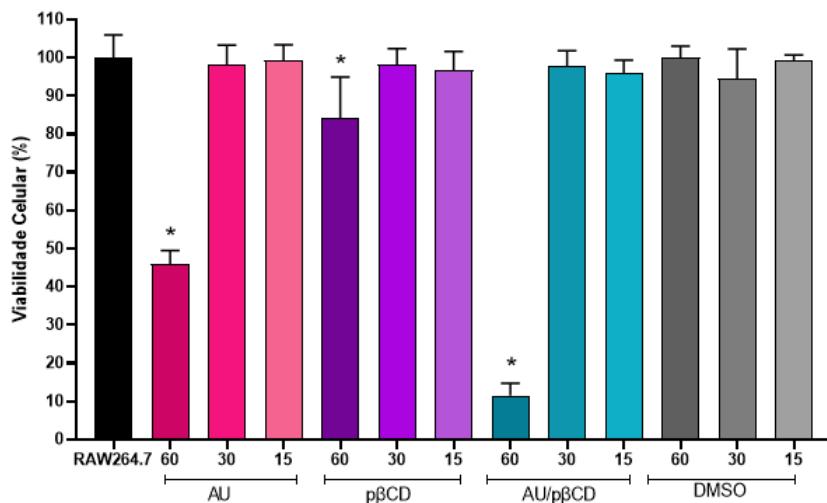
Representação gráfica das análises: (a) diâmetro hidrodinâmico (Dh); (b) potencial zeta (PZ); e (c) condutividade elétrica (K). —■— AU 30 mM em H<sub>2</sub>O, —●— AU/p $\beta$ CD 30 mM em H<sub>2</sub>O. AU: ácido ursólico; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

## 5.2 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPLEXOS

### 5.2.1 Análise *in vitro* - macrófagos J774.A1 e RAW 264.7

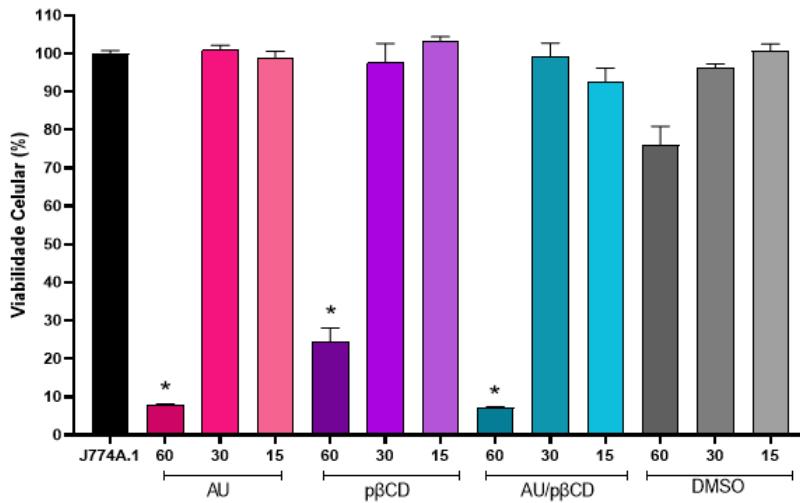
Na avaliação da viabilidade celular de macrófagos, observou-se que nas concentrações correspondentes aos tratamentos de 15 a 60 µM não houve diferença em relação ao controle negativo. Para a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 (Figuras 14 e 15), observa-se que concentrações de até 30 µM de AU e de AU/pβCD apresentam viabilidade superior a 70%. Na concentração de 60 µM o tratamento com AU/pβCD reduziu a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7, apresentando viabilidade de 11% (Figura 14). Nota-se que os macrófagos J774A.1 apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos, para a concentração de 60 µM AU/pβCD, foi observada cerca de 7% de viabilidade, uma redução de 93% de viabilidade (Figura 15).

Figura 14 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7



Células tratadas com AU, pβCD, AU/pβCD ou DMSO por 48 horas. AU: ácido ursólico; pβCD: poli-β-ciclodextrina; AU/pβCD: complexo de ácido ursólico com poli-β-ciclodextrina; DMSO: dimetilsulfóxido. Concentrações em µM. \* p < 0,05 em relação ao grupo controle (RAW264.7). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

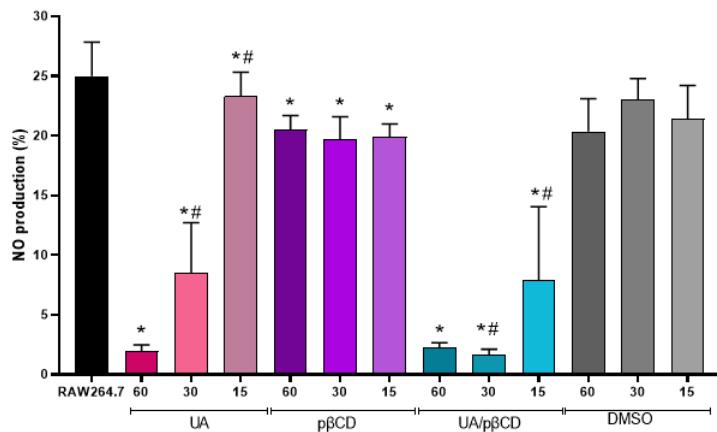
Figura 15 - Efeito dos tratamentos na viabilidade celular de macrófagos J774A.1



Células tratadas com AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD ou DMSO por 48 horas. AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; DMSO: dimetilsulfóxido. Concentrações em  $\mu$ M. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (J774.1). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

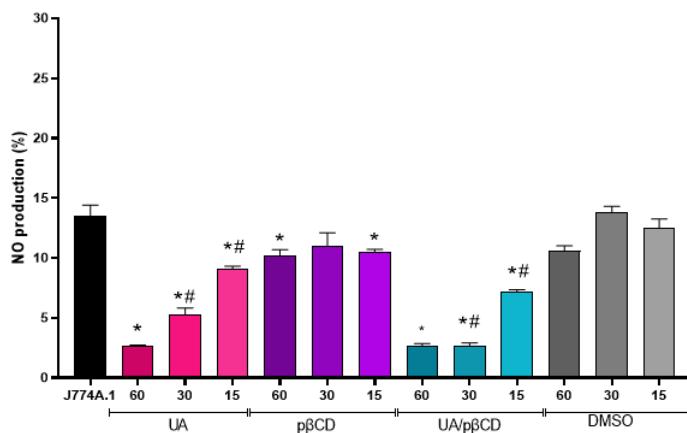
Para a inibição de NO em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 (Figuras 16 e 17), observa-se que o AU/p $\beta$ CD promoveu uma redução significativa na produção de NO em todas as concentrações testadas da linhagem RAW 264.7, com efeito mais evidente nas concentrações mais altas. Além disso, o AU/p $\beta$ CD apresentou redução significativa na produção de NO em comparação ao AU. Resultados similares foram observados em J774A.1, com inibição significativa nas concentrações de 60 e 30  $\mu$ M, apesar da concentração de 60 ter sido citotóxica.

Figura 16 - Efeito dos tratamentos na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7



Células estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  e tratadas com AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD ou DMSO por 48 horas. AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; DMSO: dimetilsulfóxido. Concentrações em  $\mu$ M. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (RAW264.7). # $p < 0,05$  em relação ao grupo AU na mesma concentração. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 17 - Efeito dos tratamentos na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774A.1

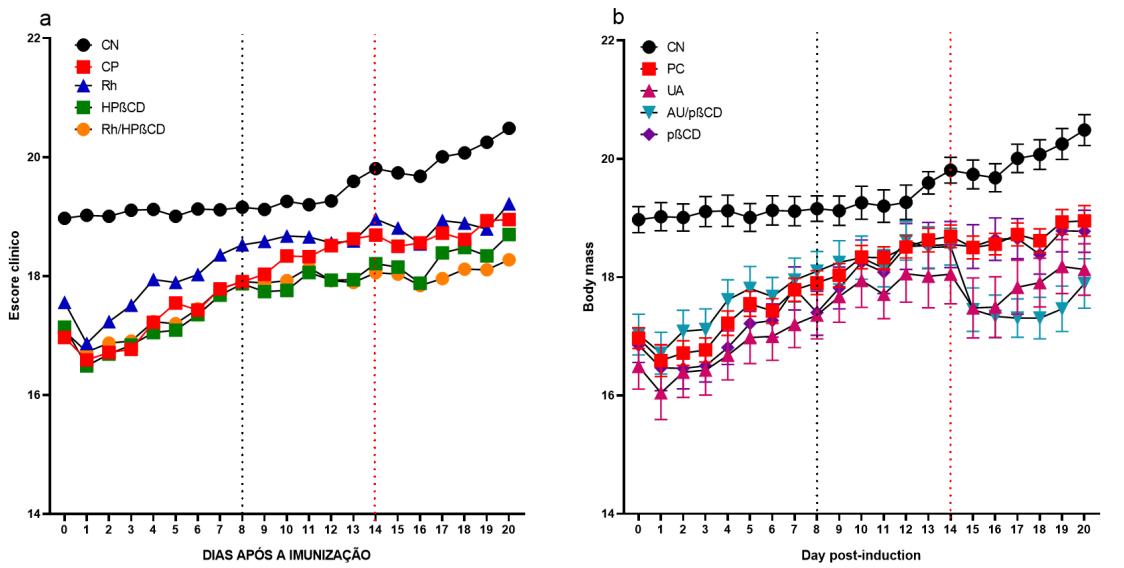


Células estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  e tratadas com AU, p $\beta$ CD, AU/p $\beta$ CD ou DMSO por 48 horas. AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; DMSO: dimetilsulfóxido. Concentrações em  $\mu$ M. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (J774.1). # $p < 0,05$  em relação ao grupo AU na mesma concentração. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

### 5.2.2 Análise *in vivo* - EAE

Conforme esperado, o grupo CN permaneceu com o EIN igual a zero ao longo de todo o experimento, enquanto os demais grupos desenvolveram sintomas neurológicos característicos da EAE a partir do 8º dpi, com o pico de severidade da doença ocorrendo no 20º dpi. Consistentes com este perfil clínico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na massa corporal dos camundongos entre os grupos durante o experimento (Figura 18).

Figura 18 – Massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não para EAE.

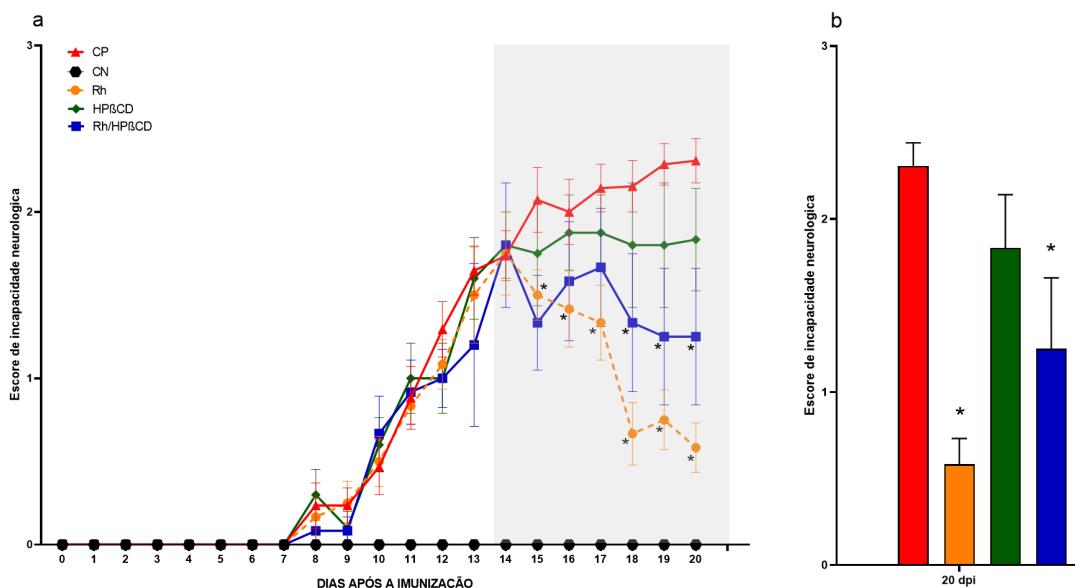


Legenda: ..... início dos sintomas neurológicos; ..... início dos tratamentos; a) Rh: cloreto de ródio, HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodexrina e Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodexrina; b) AU: ácido ursólico, p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodexrina e AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodexrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado; EAE: encefalomielite autoimune experimental. Concentrações: 5 mg/Kg de RH, HP $\beta$ CD e Rh/HP $\beta$ CD; 50 mg/Kg de AU, p $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD. Período de tratamento: 14º–20 dias após a imunização. Número de animais por grupo: n = 12–14. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em relação aos tratamentos, observou-se que o Rh reduziu significativamente o EIN em comparação ao grupo CP a partir do 15º dpi,

enquanto o complexo Rh/HP $\beta$ CD promoveu essa redução a partir do 18º dpi (Figura 19). Os tratamentos foram eficazes em reduzir o EIN, apresentando os seguintes valores: Rh ( $0,58 \pm 0,15$ ) e Rh/HP $\beta$ CD ( $1,25 \pm 0,41$ ). Em contrapartida, a HP $\beta$ CD não demonstrou atividade terapêutica, com escore de  $1,83 \pm 0,31$  no mesmo dia.

Figura 19 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6 imunizados ou não para EAE e tratados com Rh, HP $\beta$ CD ou Rh/HP $\beta$ CD.

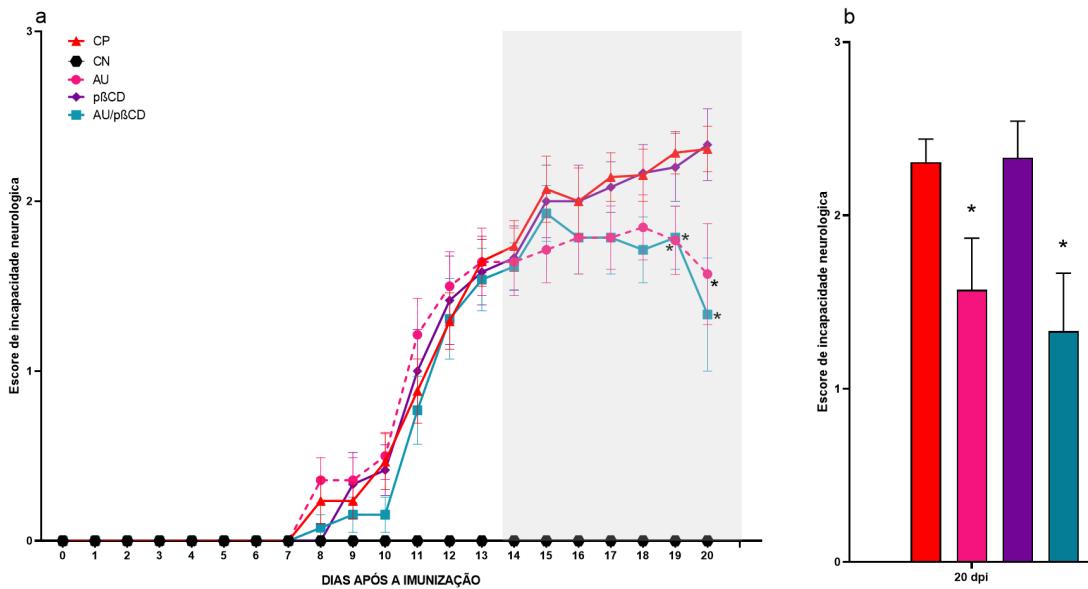


(a) Progressão clínica da EAE. (b) Magnitude do efeito no 20º dpi. Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado; EAE: encefalomielite autoimune experimental. Concentrações: 5 mg/Kg de RH, HP $\beta$ CD e Rh/HP $\beta$ CD; 50 mg/Kg de AU, p $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD. Período de tratamento: 14º–20 dias após a imunização. Número de animais por grupo: n = 12–14. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Dunnnett. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Para os compostos de AU, o efeito terapêutico significativo foi observado a partir do 19º dpi (Figura 20). No pico da doença (20º dpi), o escore neurológico do grupo CP foi de  $2,31 \pm 0,13$ . Os tratamentos foram eficazes em reduzir o EIN, apresentando os seguintes valores: AU/p $\beta$ CD ( $1,33 \pm 0,33$ ) e AU ( $1,57 \pm 0,29$ ).

Em contrapartida, a ciclodextrina isolada não demonstrou atividade terapêutica, com escore de  $2,33 \pm 0,21$  ( $\text{p}\beta\text{CD}$ ) no mesmo dia.

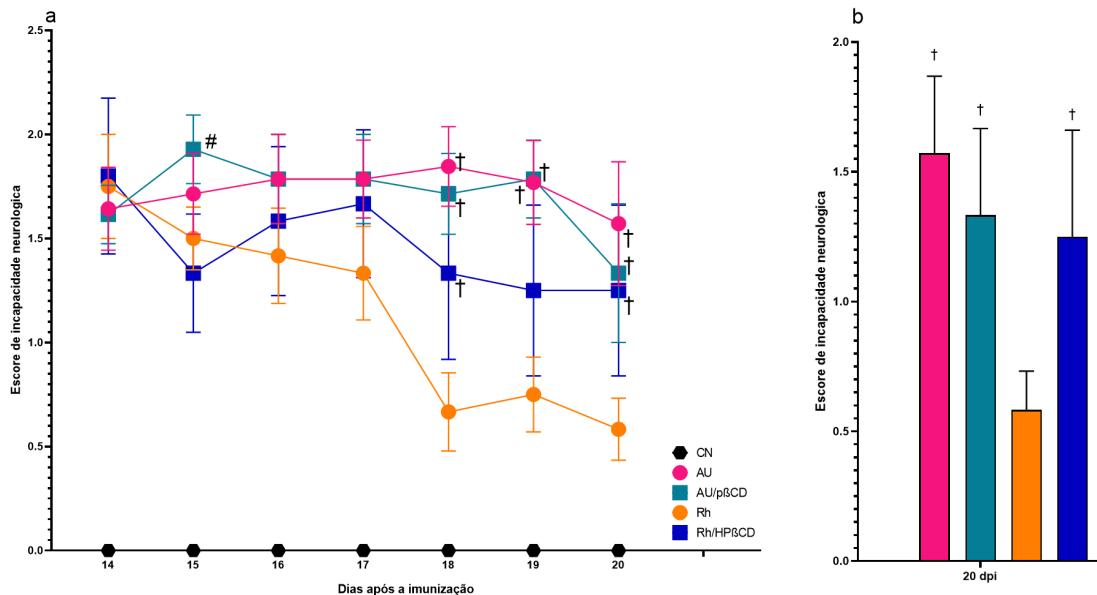
Figura 20 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6 imunizados ou não para EAE e tratados com AU,  $\text{p}\beta\text{CD}$  ou AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$ .



(a) Progressão clínica da EAE. (b) Magnitude do efeito no 20º dpi. AU: ácido ursólico;  $\text{p}\beta\text{CD}$ : poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$ : complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado; EAE: encefalomielite autoimune experimental. Concentrações: 5 mg/Kg de RH, HP $\beta$ CD e Rh/HP $\beta$ CD; 50 mg/Kg de AU,  $\text{p}\beta\text{CD}$  e AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$ . Período de tratamento: 14º–20 dias após a imunização. Número de animais por grupo: n = 12–14. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Dunnett. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A análise comparativa dos tratamentos eficazes demonstrou que, no pico da doença (18º a 20º dpi), o Rh isolado foi consistentemente superior ao AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$  e ao Rh/HP $\beta$ CD (Figura 21). A comparação com o AU isolado revelou que o Rh foi significativamente mais eficaz nos dias 18 e 20, porém ambos apresentaram eficácia estatística semelhante no 19º dpi. Além disso, a comparação entre os complexos revelou que apenas no 15º dpi, o complexo Rh/HP $\beta$ CD foi significativamente mais potente em reduzir o EIN em relação ao complexo AU/ $\text{p}\beta\text{CD}$ .

**Figura 21 - Escore de incapacidade neurológica (EIN) em camundongos C57BL/6 durante o período de tratamento (14º–20º dpi): comparação entre tratamentos eficazes**



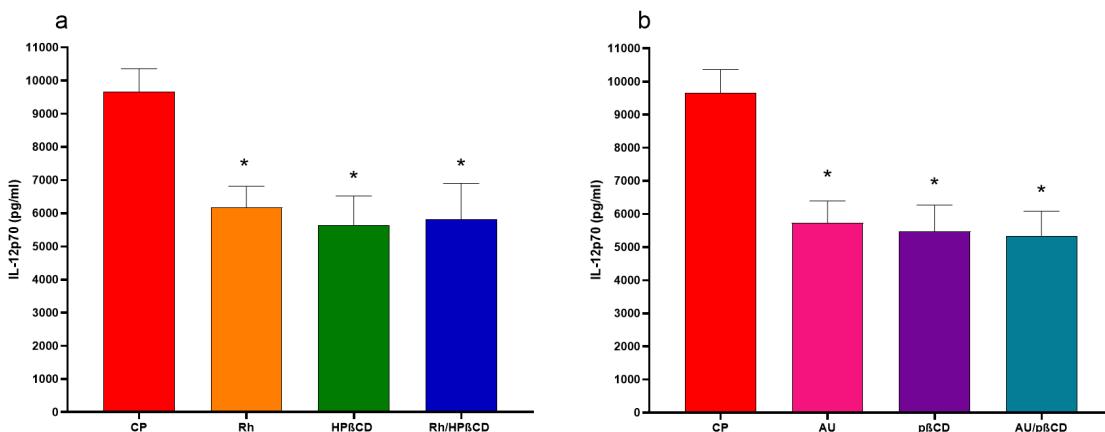
(a) Progressão clínica dos grupos eficazes em comparação ao CP. (b) Magnitude do efeito no 20º dpi. Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado; EAE: encefalomielite autoimune experimental. Concentrações: 5 mg/Kg de RH, HP $\beta$ CD e Rh/HP $\beta$ CD; 50 mg/Kg de AU, p $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD. Número de animais por grupo: n = 12–14. †p < 0,05 em relação ao grupo Rh; #p < 0,05 em relação ao grupo Rh/HP $\beta$ CD. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Tukey. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 5.2.3 Dosagem de citocina IL-12p70

A dosagem de IL-12p70 no homogeneizado cerebral revelou que tanto os compostos de Rh quanto os de AU reduziram significativamente os níveis da citocina em comparação ao grupo CP ( $9663 \pm 702$  pg/mL). Em relação ao Rh, os valores observados foram  $6170 \pm 640$  pg/mL para Rh,  $5816 \pm 1084$  pg/mL para Rh/HP $\beta$ CD e  $5650 \pm 867$  pg/mL para HP $\beta$ CD (Figura 22a). De forma análoga, para o AU, os tratamentos com AU ( $5730 \pm 666$  pg/mL), seu complexo AU/p $\beta$ CD ( $5342 \pm 743$  pg/mL) e a p $\beta$ CD ( $5480 \pm 787$  pg/mL) também levaram a uma redução acentuada nos níveis da citocina no tecido cerebral (Figura 22b). Em contraste com o efeito observado no cérebro, nenhum dos tratamentos alterou significativamente os níveis de IL-12p70 na medula espinhal (Figura 23).

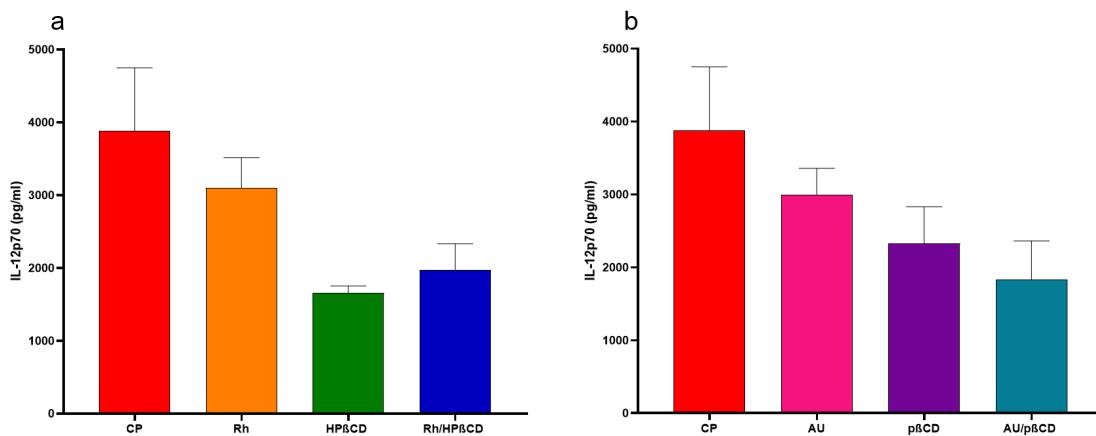
Figura 22 - Níveis de IL-12p70 no homogeneado cerebral de camundongos

C57BL/6 com EAE



Em a: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Em b:AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. EAE: encefalomielite autoimune experimental. Número de animais por grupo: n=5. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Dunnett. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 23 - Níveis de IL-12p70 na medula espinhal de camundongos C57BL/6 com EAE.



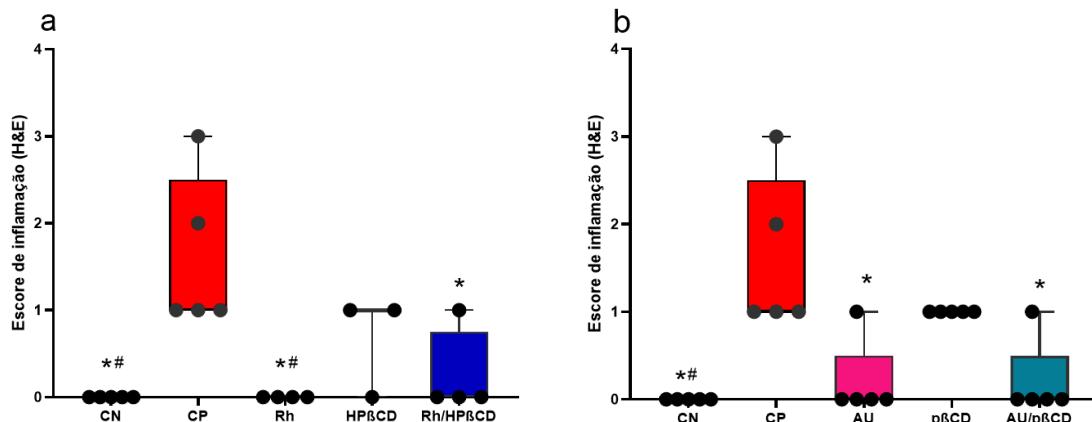
Em a: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Em b:AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. EAE: encefalomielite autoimune experimental. Número de animais por grupo: n=5. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Dunnett. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 5.2.4 Histopatologia

Na análise do infiltrado inflamatório no cérebro, o grupo CP ( $1,6 \pm 0,4$ ) apresentou escore significativamente maior do que o do grupo CN ( $0 \pm 0$ ). Em relação aos compostos de Rh, os tratamentos com Rh ( $0 \pm 0$ ) e Rh/HP $\beta$ CD ( $0,25 \pm 0,25$ ) reduziram significativamente este escore, enquanto a HP $\beta$ CD ( $0,67 \pm 0,33$ ) não demonstrou efeito terapêutico (Figuras 24a).

De forma análoga, os tratamentos com AU ( $0,2 \pm 0,2$ ) e AU/p $\beta$ CD ( $0,2 \pm 0,2$ ) reduziram o escore inflamatório. É interessante notar que a p $\beta$ CD ( $1,0 \pm 0$ ) não apresentou efeito, tendo um escore significativamente maior do que os grupos CN e Rh (Figuras 24b).

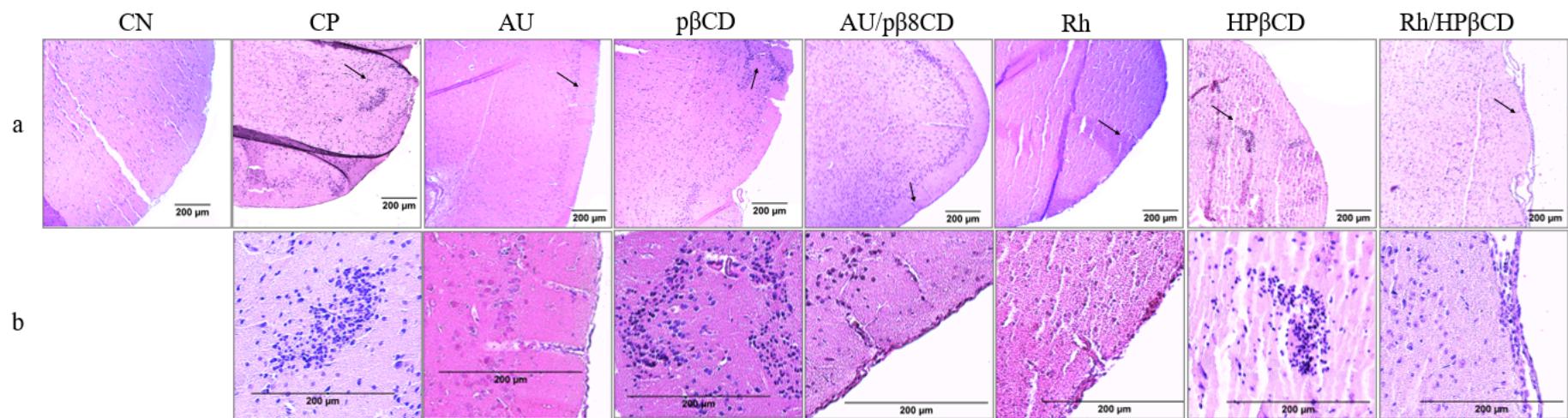
Figura 24 - Escore de inflamação do cérebro de camundongos com EAE.



Legenda: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. EAE: encefalomielite autoimune experimental. Número de animais por grupo: n=4-6. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP; #p < 0,05 em relação ao grupo p $\beta$ CD. Os dados são apresentados em box plots com escores individuais, mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn (correção de Benjamini-Hochberg). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Na figura 25 são apresentados os cortes histológicos com coloração de Hematoxilina & eosina (H&E). Em 23a observa-se aumento de 10x e em 23b são apresentados as imagens em captura de 40x.

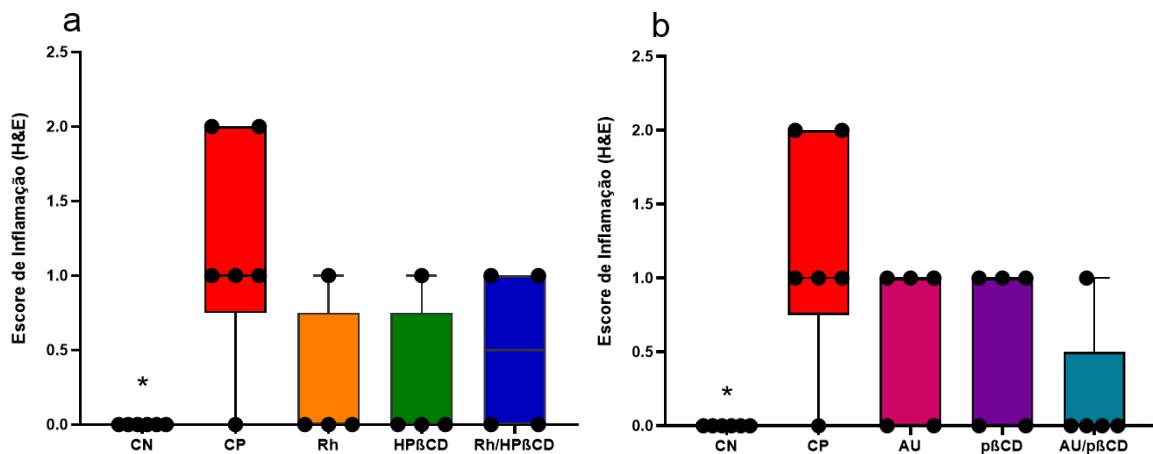
Figura 25 - Micrografias de cortes transversais de cérebro (5 µm), corados com hematoxilina e eosina (H&E).



(a) Cortes de cérebro a 10×. (b) ampliação em 40× das respectivas lâminas. As setas indicam focos inflamatórios. A barra de escala representa 200 µm. Rh: cloreto de ródio; HPβCD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HPβCD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; pβCD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/pβCD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

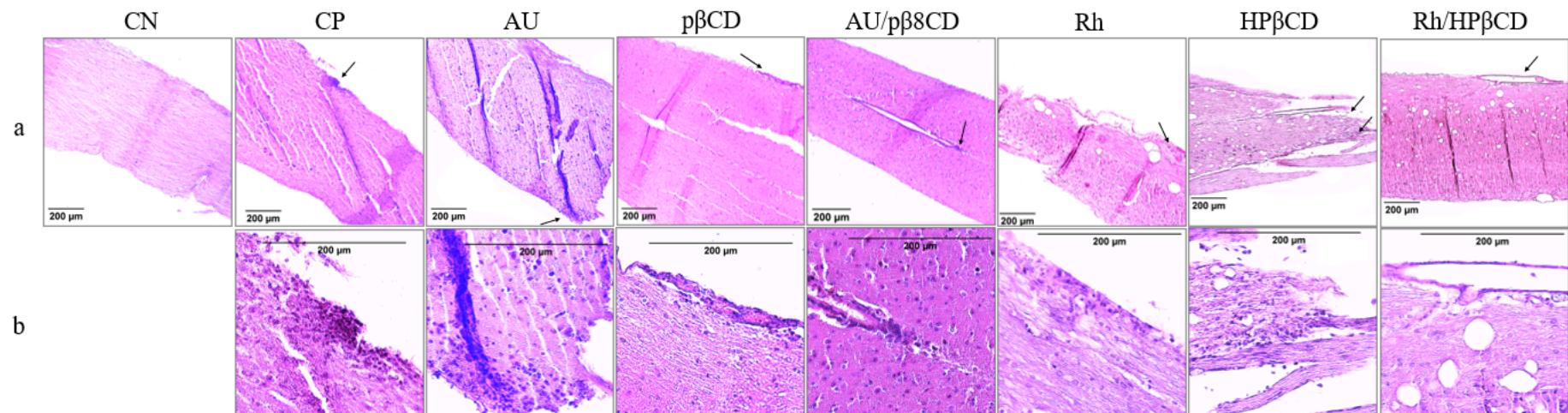
Em contraste com os achados no cérebro, na análise da medula espinhal nenhum dos tratamentos testados apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao grupo CP ( $1,17 \pm 0,31$ ), embora este tenha apresentado um escore significativamente maior que o grupo CN ( $0 \pm 0$ ) (Figuras 26). Na figura 27 são apresentados os cortes histológicos com coloração de Hematoxilina & eosina (H&E). Em 27a observa-se aumento de 10x e em 27b são apresentados as imagens em captura de 40x.

Figura 26 - Escore de inflamação da medula espinhal de camundongos com EAE.



Legenda: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. EAE: encefalomielite autoimune experimental. Número de animais por grupo: n=4-6. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados são apresentados em box plots com escores individuais, mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn (correção de Benjamini-Hochberg). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

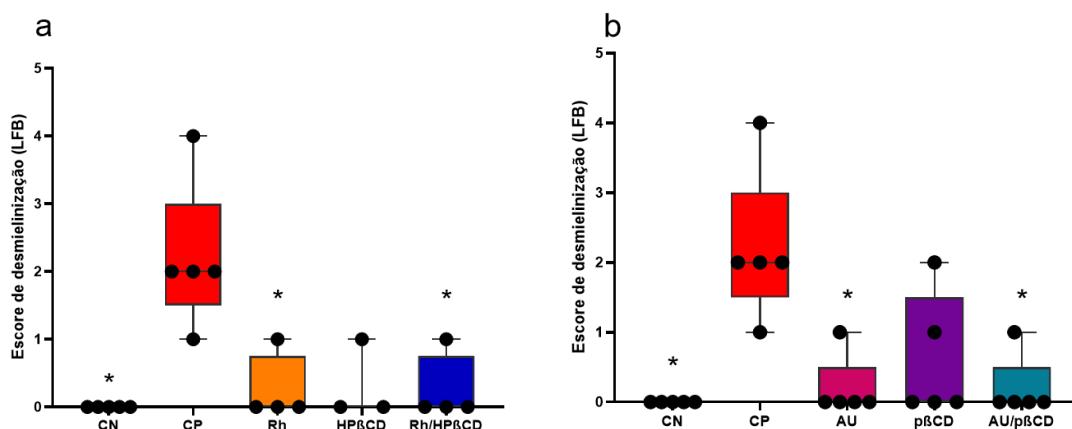
Figura 27 - Micrografias de cortes longitudinais de medula espinhal (5 µm), coradas com hematoxilina e eosina (H&E).



(a) Cortes de médula espinhal a 10×. (b) ampliação em 40× das respectivas lâminas. As setas indicam focos inflamatórios. A barra de escala representa 200 µm. Rh: cloreto de ródio; HPβCD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HPβCD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; pβCD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/pβCD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

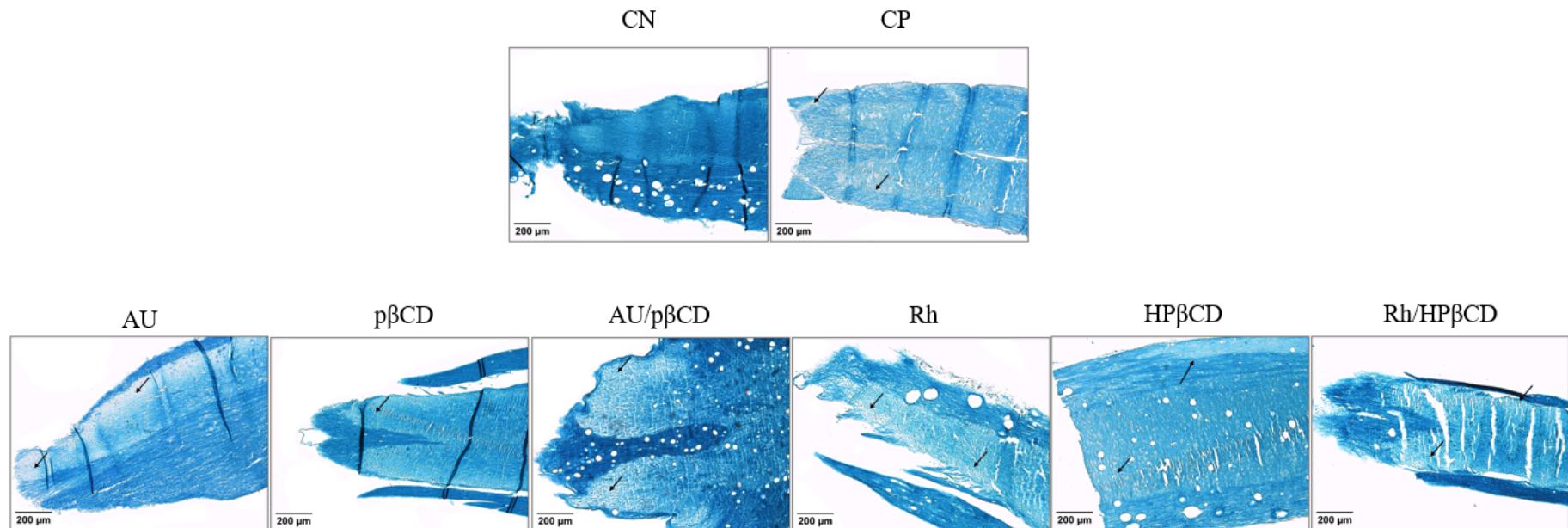
Na análise de desmielinização na medula espinhal, o escore de desmielinização do grupo CP ( $2,2 \pm 0,49$ ) foi significativamente maior do que o do grupo CN ( $0 \pm 0$ ). Para os compostos de Rh, os tratamentos com Rh ( $0,25 \pm 0,25$ ) e Rh/HP $\beta$ CD ( $0,25 \pm 0,25$ ) mantiveram a eficácia, reduzindo o escore, enquanto a HP $\beta$ CD ( $0,33 \pm 0,33$ ) não apresentou efeito neste tecido (Figuras 28a). De forma similar, AU ( $0,20 \pm 0,20$ ) e seu complexo AU/p $\beta$ CD ( $0,20 \pm 0,20$ ) também reduziram a desmielinização na medula espinhal, mas a p $\beta$ CD ( $0,6 \pm 0,4$ ) não demonstrou atividade terapêutica neste local (Figuras 28b). Na figura 29 são apresentados os cortes histológicos com coloração de Luxol Fast blue no aumento de 10x.

Figura 28 - Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos com EAE.



Legenda: Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. EAE: encefalomielite autoimune experimental. Número de animais por grupo: n=4-6. \*p < 0,05 em relação ao grupo CP. Os dados são apresentados em box plots com escores individuais, mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn (correção de Benjamini-Hochberg). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 29 - Micrografias de cortes longitudinais de medula espinhal (5 µm), coradas com Luxol Fast Blue (LFB).



Cortes de médula espinhal a 10×. Setas indicam focos de desmielinização. A barra de escala representa 200 µm. Rh: cloreto de ródio; HP $\beta$ CD: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU: ácido ursólico; p $\beta$ CD: poli- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina; CN: controle não induzido; CP: controle induzido, não tratado. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 6.DISCUSSÃO

A presente pesquisa avaliou o potencial imunomodulador de dois complexos de CDs, Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD, no modelo de EAE. Os resultados de caracterização físico-química e as análises para avaliação de bioatividade, *in vitro* e *in vivo*, permitiram confirmar a formação dos complexos e demonstrar seu potencial terapêutico.

A formação dos complexos (Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD) foi confirmada por meio de análises de FTIR e TGA/DTA. A espectroscopia de FTIR revelou alterações nas bandas características dos compostos isolados, com deslocamentos e variações de intensidade nas regiões de C=O e O-H, evidenciando o estabelecimento de novas interações intermoleculares após a complexação. Os termogramas de TGA/DTA demonstraram a ausência de sobreposição dos eventos térmicos e o deslocamento das temperaturas de decomposição evidenciando a formação de novos sistemas supramoleculares com propriedades térmicas modificadas em relação às constituintes individuais. A análise da MM do Rh/HP $\beta$ CD, em particular, mostrou que interações químicas ocorreram mesmo em ausência de um processo de coprecipitação mais intensivo, sugerindo um alto potencial de reatividade do ródio com a CD.

As CDs possuem a capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas hospedeiras, incorporando-as parcial ou totalmente em suas cavidades hidrofóbicas (Cid-Samamed et al., 2022; Popielec; Loftsson, 2017; Saokham et al., 2018). Os dados indicam que o AU/p $\beta$ CD segue essa regra, formando um complexo de inclusão na proporção 1:1, enquanto o Rh/HP $\beta$ CD foge a esse padrão, formando um complexo de coordenação na proporção molar 1:2 (Rh:HP $\beta$ CD), com estruturas nanométricas entre 200 e 500 nm (Carvalho et al., 2025).

Para AU/p $\beta$ CD, os dados de solubilidade evidenciam a formação de um complexo solúvel, com perfil de fase do tipo AL, típico de complexos estequiométricos 1:1. A linearidade observada no diagrama de solubilidade no intervalo de 0 a 12,3 mM sugere que, dentro dessa faixa, a complexação ocorre de forma eficiente e proporcional ao aumento da concentração de p $\beta$ CD, sem

evidências de saturação. Este comportamento é consistente com estudos envolvendo  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD (Huang et al., 2017; Quan et al., 2009; Song et al., 2019), diferindo daquele observado com  $\gamma$ CD, que apresentou perfil Bs, indicativo de baixa solubilidade do complexo formado (Inoue et al., 2023).

A  $K_{1,1}$  do AU/p $\beta$ CD ( $33,12\text{ M}^{-1}$ ) é inferior à constante observada para  $\gamma$ CD ( $50.000\text{ L mol}^{-1}$ ), CD-MOF-1 ( $1.500\text{ L mol}^{-1}$ ) e  $\beta$ CDs modificados (até  $1.800\text{ L mol}^{-1}$ ) (Inoue et al., 2023). A menor afinidade observada pode estar relacionada à natureza polimérica do p $\beta$ CD, que possivelmente impõe um impedimento estérico ao encaixe ideal do AU na cavidade. Mesmo assim, o  $K_{1,1}$  está dentro da faixa considerada adequada para complexos de estabilidade baixa a moderada, o que pode ser vantajoso em formulações que visam à liberação controlada ou reversível do fármaco (Feng et al., 2023). A complexação espontânea foi confirmada pelo valor negativo de  $\Delta G$  (-8,41 kJ/mol), indicando a viabilidade termodinâmica do processo.

A CE ( $2,075 \times 10^{-3}$ ) e o AS (3,31%) podem parecer modestos à primeira vista, mas demonstram que a p $\beta$ CD foi capaz de promover um ganho imensurável na solubilidade de uma molécula altamente hidrofóbica como o AU. Isso é particularmente relevante considerando-se que a p $\beta$ CD é um polímero, capaz de oferecer vantagens adicionais, como maior estabilidade físico-química e potencial de funcionalização para aplicações direcionadas. Para comparação, os valores de CE relatados para AU com outras CDs incluem UA/ $\beta$ CD em soluções tampão (pH = 9) com CE = 0,209, UA/ $\gamma$ CD com CE = 0,1 e UA/CD-MOF-1 com CE = 3,5. Nenhum desses estudos relata valores de AS para sistemas AU/CD, e tanto AS quanto CE podem variar substancialmente, dependendo do par fármaco/CD, como mostrado por Couto et al. (2019) para carbamazepina, em que AS variou de 0,97 a 110,1 e CE de 0,006 a 2,33, dependendo do derivado de CD. Assim, os experimentos de solubilidade de fase confirmaram que a complexação de AU com p $\beta$ CD aumentou a solubilidade em meio aquoso. No entanto, embora o AU/p $\beta$ CD tenha maior solubilidade do que o AU puro, sua solubilidade absoluta permanece baixa, sugerindo a necessidade do uso de um cosolvente para dispersar o material em meio aquoso em aplicações futuras.

Para contornar essa limitação, foi utilizado o conceito de nanoprecipitados

hidrofóbicos (NPHs), que são partículas sólidas insolúveis em água, tipicamente formadas em misturas de solventes em que a água é o componente primário (Bittencourt et al., 2021; Dos Santos Moreira et al., 2018). Uma das principais vantagens dessa abordagem é a capacidade de desenvolver formulações simples, sem depender de aditivos ou surfactantes caros, funcionando como um sistema de liberação baseado na dissolução da fase sólida.

Os dados indicam que tanto o AU quanto o AU/p $\beta$ CD formam NPHs ao misturar suas soluções de DMSO com água, com o tamanho de partícula e o PZ fortemente influenciados pela concentração. Em ambos os sistemas, o tamanho da partícula aumenta com a concentração, provavelmente devido à saturação da suspensão e à maior probabilidade de colisões entre partículas. Os valores de Dh são maiores no sistema AU/p $\beta$ CD do que no sistema apenas com AU, devido a diferentes interações internas e com o ambiente, além da presença das macromoléculas de p $\beta$ CD.

Valores negativos de PZ foram observados em ambos os sistemas, atribuídos à presença de espécies aniónicas. No sistema AU, isso resulta da ionização parcial ( $AU^-$ ), enquanto no sistema AU/p $\beta$ CD, decorre da ionização tanto do AU quanto do p $\beta$ CD ( $AU^-$  e  $p\beta CD^{n-}$ ). Curiosamente, o sistema AU/p $\beta$ CD exibiu valores de PZ menores acima de 2,5 mM, acompanhados de condutividades significativamente maiores. A condutividade elevada provavelmente se deve à presença de íons  $Na^+$ , resultantes da síntese de p $\beta$ CD em condições básicas (Renard et al., 1997). Em relação aos valores reduzidos de PZ no sistema AU/p $\beta$ CD, hipotetiza-se que a complexação promove ligações de hidrogênio ou interações íon-dipolo, que suprimem a ionização do AU. Além disso, a abundância de íons  $Na^+$  pode neutralizar parcialmente a dupla camada elétrica que envolve o AU/p $\beta$ CD, reduzindo ainda mais seus valores de ZP.

Diante das particularidades observadas, o Quadro 4 apresenta um comparativo estrutural entre os dois sistemas desenvolvidos, correlacionando a representação esquemática dos complexos com seus respectivos dados de interação e tamanho de partícula.

Quadro 4 – Comparativo estrutural e físico-químico dos complexos.

Característica	Complexo Rh/HP $\beta$ CD	Complexo AU/p $\beta$ CD
<b>Representação</b>		
<b>Tipo de Interação</b>	Complexo de Coordenação.	Complexo de Inclusão.
<b>Estequiometria</b>	1:2	1:1
<b>Tamanho de Partícula</b>	Estruturas nanométricas entre 200 e 500 nm.	Nanoprecipitados Hidrofóbicos (NPHs) entre 600 e 1100 nm.

Rh/HP $\beta$ CD: complexo de ródio com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; AU/p $\beta$ CD: complexo de ácido ursólico com poli- $\beta$ -ciclodextrina. **Fonte:** Elaborado pela autora (2025).

Os ensaios de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1, realizados com o AU/p $\beta$ CD, demonstraram que o composto não apresentou citotoxicidade significativa em concentrações de até 30  $\mu$ M, o que o torna seguro para testes de bioatividade (ISO, 2009). Observou-se maior sensibilidade dos macrófagos J774A.1 aos tratamentos, o que está de acordo com dados da literatura que apontam diferenças intrínsecas na susceptibilidade celular frente a compostos bioativos (Feito et al., 2021; Gunawardena et al., 2015).

Tendo estabelecido a segurança da formulação, foi possível investigar sua atividade imunomoduladora. Conforme discutido, a presença do polímero de p $\beta$ CD altera fundamentalmente a organização físico-química dos NPHs, e demonstrou-se que essa alteração estrutural teve uma consequência biológica direta: o complexo AU/p $\beta$ CD demonstrou ser significativamente mais potente na inibição da produção de NO por macrófagos do que o AU isolado. Esse efeito, mais pronunciado para o complexo, pode refletir um sinergismo ou uma maior biodisponibilidade promovida pela complexação com a p $\beta$ CD. A inibição do NO, especialmente em concentrações não citotóxicas, é um forte indicativo de

potencial imunomodulador, sugerindo uma capacidade de suprimir o fenótipo pró-inflamatório de macrófagos (M1), caracterizado pela alta expressão de iNOS e produção de espécies reativas (Cherry; Olschowka; O'Banion, 2014; Jiang; Jiang; Zhang, 2014; Liy et al., 2021; Man et al., 2022). Esse achado ganha relevância adicional quando se considera que o NO está diretamente implicado na fisiopatologia de doenças neuroinflamatórias, como a EM, sendo associado à exacerbação do dano tecidual e à progressão da resposta inflamatória (Liy et al., 2021; Staykova; Bruestle, 2025).

No modelo *in vivo*, os tratamentos demonstraram eficácia em atenuar o EIN, embora com diferentes temporalidades e potências, tendo o pico da doença no 20º dpi como ponto de referência crítico. O grupo tratado com Rh isolado apresentou o início de resposta terapêutica mais precoce, a partir do 15º dpi. Sua eficácia tornou-se ainda mais proeminente durante o pico inflamatório (17º a 20º dpi), quando demonstrou uma melhora estatisticamente superior não apenas em relação aos grupos tratados com AU e AU/pβCD, mas também em relação à própria formulação complexada (Rh/HPβCD).

O balanço entre eficácia e formulação ganha uma perspectiva mais clara quando se consideram os desafios intrínsecos ao Rh. O Rh isolado, embora tenha emergido como o composto mais promissor neste ensaio, tem seu uso terapêutico limitado por questões farmacocinéticas, como rápida excreção (Czerczak et al., 2012), e, mais importante, por um potencial nefrotóxico já relatado na literatura (Iavicoli et al., 2014). Nesse contexto, a complexação com HPβCD não é apenas uma otimização, mas uma estratégia fundamental para mitigar riscos e melhorar o perfil de segurança de um agente promissor. Contudo, a dinâmica de liberação do fármaco mediada pela ciclodextrina explica a atenuação da eficácia observada no pico da doença. A literatura estabelece que apenas a forma livre do composto é capaz de atravessar membranas biológicas lipofílicas (Loftsson et al., 2005). Assim, o Rh isolado estaria imediatamente disponível para exercer seu efeito, enquanto o complexo atuaria como um reservatório, resultando em uma concentração máxima (Cmax) mais baixa no SNC. Este perfil de liberação mais controlado, embora resulte em uma potência de pico inferior, é o contraponto esperado para obter um perfil de segurança potencialmente superior.

A relevância destes achados é ampliada quando comparados com estudos prévios. Carvalho et al. (2025) validaram a atividade anti-inflamatória de ambas as formulações em um modelo de inflamação aguda periférica (edema de pata), no qual o composto não precisa atravessar a BHE. Nosso estudo, ao utilizar o modelo de EAE, avança significativamente nesse entendimento, revelando que a máxima disponibilidade do Rh para cruzar a barreira é o fator determinante para controlar a fase aguda da neuroinflamação, uma dinâmica impossível de ser observada em modelos de inflamação sistémica.

Em contraste, os tratamentos com AU isolado e AU/p $\beta$ CD apresentaram um início de efeito mais tardio, a partir do 19º dpi. Os resultados não indicaram diferença estatisticamente significativa entre AU e AU/p $\beta$ CD, sugerindo que a complexação com p $\beta$ CD não comprometeu a atividade terapêutica do composto, validando-a como uma estratégia para melhorar as propriedades farmacocinéticas sem prejuízo da eficácia. Tais dados corroboram achados anteriores sobre o potencial do AU em modelos de EAE (Alfei; Schito; Zuccari, 2021; Zhang et al., 2020). Outro fato importante a ser destacado foi que a comparação direta entre os tratamentos, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD apenas no 15º dpi, indicando mecanismos ou potenciais de ação distintas desde o início da resposta terapêutica.

No modelo de EAE, a perda de massa corporal na fase aguda da doença frequentemente está correlacionada à gravidade clínica e ao mal-estar geral do animal, sendo atribuída a fatores como paralisia, dificuldade de acesso ao alimento e ao aumento sistêmico de citocinas inflamatórias (Robat-Jazi et al., 2023). Contudo, no presente estudo, não foram observadas alterações significativas no peso corporal em nenhum dos grupos, o que é consistente com o perfil neurológico observado, que se mostrou brando e atingiu um EIN médio máximo de 2,3 (grupo p $\beta$ CD). Desta forma, a manutenção do peso nos grupos tratados reforça o perfil de segurança dos compostos, indicando que não houve indução de toxicidade sistêmica que tenha impactado o estado geral dos animais.

As análises *ex vivo* no SNC foram fundamentais para investigar os mecanismos neuroprotetores e imunomoduladores subjacentes aos efeitos clínicos. A modulação da resposta imune foi evidenciada pela dosagem da

citocina pró-inflamatória IL-12p70. No cérebro, todos os grupos de tratamento, incluindo as CDs isoladas, promoveram uma redução significativa nos níveis de IL-12p70. Embora não tenhamos avaliado IL-4 ou IL-10, a redução de IL-12p70, associada à inibição da produção de NO e, em alguns casos, à inibição de NF-κB em macrófagos (Carvalho et al., 2025; Scherrer et al., 2023), sugere um desvio da resposta imune para um perfil anti-inflamatório. A redução da IL-12p70 reflete diretamente uma modulação no comportamento da imunidade inata, indicando a supressão da polarização clássica (M1) de macrófagos, células que são as principais fontes desta citocina no SNC inflamado (Cherry; Olschowka; O'Banion, 2014; Chu et al., 2021; Jiang; Jiang; Zhang, 2014). Essa modulação do eixo M1/M2 impacta, consequentemente, a resposta adaptativa, uma vez que a IL-12 é o sinal chave para a diferenciação de linfócitos Th1 (Chu et al., 2021; Haki et al., 2024; Jana et al., 2024; Upadhye et al., 2025; Viswanathan et al., 2025). Mecanicamente, isso se alinha à inibição do NF-κB, fator de transcrição que orquestra tanto o fenótipo M1 (expressão de iNOS e IL-12) quanto a polarização Th1 em detrimento do Th2 (Chu et al., 2021; Haki et al., 2024; Jana et al., 2024; Upadhye et al., 2025; Viswanathan et al., 2025). O trabalho de Chu et al. (2021) corrobora diretamente essa conexão, ao demonstrar que o bloqueio da via de NF-κB em camundongos com EAE resultou em uma diminuição significativa de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-12p70.

De forma interessante, as CDs isoladas ( $\text{p}\beta\text{CD}$  e  $\text{HP}\beta\text{CD}$ ) promoveram uma redução significativa da IL-12p70 no cérebro. Este dado corrobora a crescente evidência na literatura de que as CDs não são meros excipientes inertes, mas possuem bioatividade imunomoduladora intrínseca, possivelmente por meio da modulação do colesterol nas membranas de células imunes (Appleton et al., 2021; Matassoli et al., 2018; Zimmer et al., 2016). Contudo, essa ação imunomoduladora cerebral não se traduziu em melhora histopatológica ou clínica, o que indica um efeito insuficiente para impactar a doença de forma global. A explicação mais robusta para essa desconexão reside nas limitações farmacocinéticas das ciclodextrinas no SNC. Embora as CDs sejam promissoras para o tratamento de algumas patologias neurodegenerativas (Braga, 2023; Vecsernyés et al., 2014; Xing; Meng; Chen, 2024), a literatura demonstra que a

HP $\beta$ CD, em particular, atravessa a BHE de forma lenta e heterogênea e, mais crucial para este estudo, apresenta uma captação praticamente indetectável pela medula espinhal (Banks et al., 2019; Braga, 2023; Camargo et al., 2001; Veszelka et al., 2022).

As evidências farmacocinéticas oferecem um embasamento unificador para múltiplos achados deste trabalho. Primeiramente, a penetração lenta e parcial no cérebro é consistente com a observação de um efeito apenas parcial, uma modulação bioquímica (redução de IL-12p70) sem a força necessária para resolver o infiltrado inflamatório. Em segundo lugar, a ausência de captação pela medula espinhal explica diretamente a falha das CDs em exercer qualquer efeito neuroprotetor neste compartimento. Finalmente, esta mesma limitação de biodisponibilidade da HP $\beta$ CD no SNC fornece a justificativa farmacocinética para a eficácia atenuada do complexo Rh/HP $\beta$ CD em comparação ao Rh isolado, conforme discutido anteriormente.

A análise histopatológica corroborou e ampliou os achados, revelando uma clara compartmentalização da resposta terapêutica. No cérebro, a redução do infiltrado inflamatório pelos grupos Rh, Rh/HP $\beta$ CD, AU e AU/p $\beta$ CD foi consistente com a supressão local de IL-12p70 e alinhou-se diretamente à melhora clínica. Em contrapartida, na medula espinhal, a narrativa foi outra: nenhum tratamento conseguiu reduzir significativamente o infiltrado inflamatório, cuja presença e características são consistentes com a patologia descrita para o modelo de EAE induzido por MOG<sub>35-55</sub> utilizando camundongos C57BL/6 (Constantinescu et al., 2011). Neste modelo é característica uma maior inflamação medular com presença de infiltrado inflamatório multifocal e confluente, diferente da inflamação cerebral mais contida com presença de meningites e manguitos inflamatórios perivasculares (Constantinescu et al., 2011). Assim, enquanto no cérebro os tratamentos foram eficazes em reduzir o acúmulo de células inflamatórias, na medula, a agressividade da patologia local parece ter superado a capacidade dos compostos de controlar o recrutamento celular.

A análise da desmielinização na medula espinhal revelou um ponto-chave deste trabalho. Apesar dos principais tratamentos (Rh, Rh/HP $\beta$ CD, AU e AU/p $\beta$ CD) não terem sido capazes de reduzir a inflamação medular, eles foram

significativamente eficazes na redução da desmielinização neste tecido, sugerindo um efeito neuroprotetor direto e independente de sua ação anti-inflamatória. Diferentemente do cérebro, onde a redução da IL-12p70 permitiu inferir uma modulação da resposta imune, a ausência desta alteração na medula espinhal impede a formulação de hipóteses semelhantes sobre uma repolarização funcional de Th1 para Th2 neste compartimento. A natureza precisa do mecanismo por trás desta neuroproteção direta permanece em aberto, mas é plausível que envolva a modulação de vias intrínsecas de sobrevida e resistência ao estresse nos próprios oligodendrócitos ou a proteção direta dos axônios contra o microambiente neurotóxico. Assim, este estudo não apenas demonstra um efeito neuroprotetor, mas também evidencia sua ocorrência em um contexto de inflamação não resolvida, um achado de grande relevância terapêutica. A elucidação das vias moleculares específicas que governam este efeito protetor direto constitui uma importante e necessária perspectiva para futuros estudos.

Em resumo, este trabalho demonstra que a atenuação da EAE pelos tratamentos desenvolvidos decorre de uma ação multifacetada e compartmentalizada. A eficácia clínica não foi suficientemente explicada pela imunomodulação no cérebro, revelando que o efeito neuroprotetor direto na medula espinhal, ocorrendo de forma independente da resolução do infiltrado inflamatório local, era o componente crítico e indispensável para o sucesso terapêutico. Nesse cenário, o Rh isolado emergiu como o composto de maior eficácia clínica, provavelmente devido a um perfil farmacocinético que permitiu um controle mais potente da patologia medular. Sua complexação (Rh/HP $\beta$ CD) ilustra um clássico compromisso farmacológico: a atenuação da eficácia clínica pode ser o contraponto de uma potencial melhoria no perfil de segurança, um aspecto crucial a ser validado em estudos toxicológicos futuros. Para o AU, a complexação (AU/p $\beta$ CD) demonstrou-se uma estratégia farmacotécnica bem-sucedida. Ela viabilizou uma formulação que não apenas manteve a eficácia terapêutica do composto isolado *in vivo*, mas também demonstrou uma potência imunomodulatória superior *in vitro*, validando-a como uma plataforma promissora para futuras otimizações. Coletivamente, este trabalho avança para além da simples demonstração de eficácia e redefine o desafio terapêutico: a atenuação

da neuroinflamação não reside apenas em modular a resposta imune, mas, crucialmente, em garantir a chegada de agentes neuroprotetores ao microambiente da medula espinhal.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito imunomodulador dos complexos Rh/HP $\beta$ CD e AU/p $\beta$ CD no modelo de EAE. Os objetivos propostos foram alcançados e os resultados, em conjunto, não apenas validaram o potencial terapêutico das formulações, mas também permitiram a elucidação de um mecanismo de ação complexo, multifacetado e compartimentalizado.

O percurso experimental iniciou-se com a síntese e a caracterização dos complexos, em que o método de coprecipitação/liofilização mostrou-se eficaz para a formação de novos sistemas supramoleculares com propriedades distintas das de seus constituintes originais. A avaliação *in vitro* do complexo AU/p $\beta$ CD demonstrou sua segurança para macrófagos e, notavelmente, revelou potência superior na inibição da produção de NO em comparação ao composto livre. Estes achados indicam que a complexação foi uma estratégia bem-sucedida para modular positivamente a atividade anti-inflamatória.

O ponto central do estudo reside na avaliação *in vivo*, na qual todos os tratamentos (Rh, Rh/HP $\beta$ CD, AU e AU/p $\beta$ CD) atenuaram a progressão da doença neurológica sem causar toxicidade sistêmica aparente. A análise mecanística revelou que o sucesso terapêutico depende de uma ação combinada: uma resposta anti-inflamatória robusta no cérebro, evidenciada pela redução do infiltrado, e um efeito neuroprotetor direto na medula espinhal. A proteção contra a desmielinização medular, observada mesmo em um ambiente de inflamação não resolvida, emergiu como um evento central e indispensável para a melhora clínica. Neste contexto, o Rh isolado apresentou a maior eficácia clínica, enquanto sua complexação (Rh/HP $\beta$ CD) evidenciou um clássico compromisso farmacológico entre potência e um perfil de segurança potencialmente aprimorado.

Apesar dos resultados promissores, é fundamental reconhecer as limitações deste estudo para contextualizar adequadamente o alcance de suas conclusões. Embora uma neuroproteção direta na medula espinhal tenha sido claramente demonstrada, o mecanismo molecular preciso por trás deste efeito

permanece indefinido, uma vez que não foi possível inferi-lo a partir dos marcadores analisados neste compartimento. Além disso, o perfil imunológico focou-se na IL-12p70, oferecendo um retrato incompleto da complexa rede de citocinas na EAE. Por fim, a ausência de dados experimentais de farmacocinética e de biodistribuição limita a confirmação das hipóteses sobre as diferenças de eficácia entre os compostos livres e seus respectivos complexos.

Essas limitações delineiam um programa de pesquisa claro e perspectivas futuras. A principal prioridade é a elucidação do mecanismo de neuroproteção direta, por meio da investigação das vias moleculares associadas à preservação da mielina na medula espinhal. Em paralelo, a análise de um painel expandido de citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), assim como a fenotipagem de linfócitos (Th1, Th2, Th17, Treg) por citometria de fluxo ou imuno-histoquímica, permitirá uma compreensão mais abrangente do impacto imunomodulador das formulações. Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição são indispensáveis para esclarecer as diferenças de eficácia e otimizar as formulações. Por fim, para consolidar o potencial translacional, especialmente do Rh e de seu complexo, é fundamental o desenvolvimento de estudos toxicológicos detalhados, voltados à determinação da janela terapêutica e à avaliação de possíveis efeitos nefrotóxicos.

Em suma, este trabalho cumpriu seu objetivo ao desenvolver e validar novas formulações terapêuticas com potencial imunomodulador e neuroprotetor. Sua maior contribuição reside na elucidação de um mecanismo de ação dual, demonstrando que a melhora clínica na EAE requer não apenas uma ação anti-inflamatória cerebral, mas também um efeito neuroprotetor direto na medula espinhal capaz de preservar a mielina mesmo em um ambiente inflamatório não resolvido. Esses achados reforçam a importância de abordagens terapêuticas integradas, voltadas simultaneamente à modulação imune e à neuroproteção, na busca por estratégias eficazes contra doenças desmielinizantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFEI, Silvana; SCHITO, Anna Maria; ZUCCARI, Guendalina. Considerable Improvement of Ursolic Acid Water Solubility by Its Encapsulation in Dendrimer Nanoparticles: Design, Synthesis and Physicochemical Characterization. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2196, 26 ago. 2021.
- APPLETON, Silvia Lucia et al. Cyclodextrins as Anti-inflammatory Agents: Basis, Drugs and Perspectives. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1384, set. 2021.
- ATTFIELD, Kathrine E. et al. The immunology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 12, p. 734–750, dez. 2022.
- BANKS, W. A. et al. Modest Blood-Brain Barrier Permeability of the Cyclodextrin Kleptose: Modification by Efflux and Luminal Surface Binding. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 371, n. 1, p. 121–129, out. 2019.
- BEBO, Bruce et al. The Economic Burden of Multiple Sclerosis in the United States. **Neurology**, v. 98, n. 18, p. e1810–e1817, 3 maio 2022.
- BERARD, Jennifer L. et al. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Glia**, v. 58, n. 4, p. 434–445, mar. 2010.
- BIEŃ, M. et al. Studies of antibacterial activity of binuclear rhodium (II) complexes with heterocyclic nitrogen ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 73, n. 1–2, p. 49–55, 1999.
- BIERHANSL, Laura et al. Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 578–600, ago. 2022.
- BITTNER, Stefan et al. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 86, p. 51275, 15 abr. 2014.
- BORDIGNON, Valentina et al. Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. **BMC immunology**, v. 9, p. 19, 15 maio 2008.
- BOSCOLO, Paolo et al. Different Effects of Platinum, Palladium, and Rhodium Salts on Lymphocyte Proliferation and Cytokine Release. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 34, n. 3, p. 299–306, 7 jan. 2004.
- BRAGA, Susana Santos. Molecular Mind Games: The Medicinal Action of Cyclodextrins in Neurodegenerative Diseases. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 666, abr. 2023.

BURMAN, Joachim. Delaying the inevitable: Are disease modifying drugs for progressive MS worthwhile? **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 54, p. 103134, set. 2021.

CALLEGARI, Ilaria; DERFUSS, Tobias; GALLI, Edoardo. Update on treatment in multiple sclerosis. **Presse Medicale (Paris, France: 1983)**, v. 50, n. 2, p. 104068, jun. 2021.

CAMARGO, Fernando *et al.* Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. **Life Sciences**, v. 70, n. 2, p. 131–142, 30 nov. 2001.

CARVALHO, Paloma E. *et al.* Evaluation of the Immunomodulatory Potential of Rhodium(III) Complexes with Cyclodextrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 7, p. e-20250062, 9 maio 2025.

CASTRO, Sandra B. R. *et al.* Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- $\alpha$  in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 3, p. 347–352, mar. 2012.

CHATAWAY, Jeremy *et al.* Secondary progressive multiple sclerosis: a systematic review of costs and health state utilities. **Current Medical Research and Opinion**, v. 37, n. 6, p. 995–1004, jun. 2021.

CHEMSPIDER. **Rhodium(3+) chloride hydrate (1:3:3)**. Disponível em: <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.140401.html>>. Acesso em: 8 set. 2025.

CHENG, Yun *et al.* Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 10, p. 1973–1983, out. 2017.

CHERRY, Jonathan D.; OLSCHOWKA, John A.; O'BANION, M. Kerry. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 98, 3 jun. 2014.

CHU, F. *et al.* Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice via blockading NF- $\kappa$ B pathway. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 204, n. 2, p. 199–211, 1 maio 2021.

CID-SAMAMED, Antonio *et al.* Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132467, 1 ago. 2022.

**CMED. REÇO FÁBRICA - PF (PREÇO PARA LABORATÓRIOS E DISTRIBUIDORES) PREÇO MÁXIMO AO CONSUMIDOR - PMC (PREÇO PARA FARMÁCIAS E DROGARIAS).** [S.I.: S.n.] Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/precos>>.

CONSTANTINESCU, Cris S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, out. 2011.

CZERCZAK, Slawomir et al. Nickel, Ruthenium, Rhodium, Palladium, Osmium, and Platinum. In: **Patty's Toxicology**. 6. ed. [S.I.]: Eula Bingham e Barbara Cohsen, 2012. v. 1.

DA SILVA JÚNIOR, Walter Ferreira et al. Inclusion Complexes of  $\beta$  and HP $\beta$ -Cyclodextrin with  $\alpha$ ,  $\beta$  Amyrin and In Vitro Anti-Inflammatory Activity. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 241, 21 jun. 2019.

DA SILVA, Nilceia Lopes et al. Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study. **BMC Health Services Research**, v. 16, p. 102, 24 mar. 2016.

DARGAHI, Narges et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain Sciences**, v. 7, n. 7, p. 78, 7 jul. 2017.

DE PAULA, Marcio L. et al. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1291–1297, set. 2008.

DI CAGNO, Massimiliano. The Potential of Cyclodextrins as Novel Active Pharmaceutical Ingredients: A Short Overview. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1, 25 dez. 2016.

DÍAZ, Cindy; ZARCO, Luis Alfonso; RIVERA, Diego M. Highly active multiple sclerosis: An update. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 30, p. 215–224, maio 2019.

DINIZ, Isabela Maia. Esclerose Múltipla: gastos em medicamentos do componente especializado, serviços ambulatoriais e hospitalares em uma coorte de dezesseis anos. 18 ago. 2017.

DINIZ, Isabela Maia et al. The long-term costs for treating multiple sclerosis in a 16-year retrospective cohort study in Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0199446, 21 jun. 2018.

DOAN, Anh Thi Ngoc; KOJIMA, Natsuki; SAKURAI, Kazuo. Reduced nephrotoxicity of epichlorohydrin-crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles ( $\beta$ CDNPs) and its enhanced binding with hydrophobic compounds. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 39, n. 6, p. 522–535, 1 nov. 2024.

DUAN, Haoyang et al. Rehabilitation treatment of multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1168821, 6 abr. 2023.

ELLEN, Olivia *et al.* The Heterogeneous Multiple Sclerosis Lesion: How Can We Assess and Modify a Degenerating Lesion? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11112, jan. 2023.

FEITO, M. J. *et al.* Response of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 208, p. 112110, dez. 2021.

FENG, Yan *et al.* A review of controlled release from cyclodextrins: release methods, release systems and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 20, p. 4744–4756, 7 ago. 2023.

GHOLAMZAD, Mehrdad *et al.* A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. **Inflammation Research**, v. 68, n. 1, p. 25–38, jan. 2019.

GOMBOLAY, Grace *et al.* Worldwide epidemiology of paediatric multiple sclerosis: data from the Multiple Sclerosis International Federation Atlas of MS, third edition. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 96, n. 8, p. 814–820, 1 ago. 2025.

GOSWAMI, Sathi; SARKAR, Munna. Fluorescence, FTIR and  $^1\text{H}$  NMR studies of the inclusion complexes of the painkiller Iornoxicam with  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins and their hydroxy propyl derivatives in aqueous solutions at different pHs and in the solid state. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 18, p. 15146–15156, 10 set. 2018.

GOVINDARAJAN, Vaidya; DE RIVERO VACCARI, Juan Pablo; KEANE, Robert W. Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 260, dez. 2020.

GUNAWARDENA, Dhanushka *et al.* Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 910–919, mar. 2015.

GUO, Yu-Xin *et al.* Role of Plant-Derived Natural Compounds in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Review of the Treatment Potential and Development Strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 639651, 28 jun. 2021.

HAKI, Maha *et al.* Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. **Medicine**, v. 103, n. 8, p. e37297, 23 fev. 2024.

HAUSER, Stephen L.; CREE, Bruce A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 12, p. 1380- 1390.e2, dez. 2020.

HIGUCHI, Takeru; CONNORS, Kenneth A. **Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation.** [S.l.: S.n.]. v. 4

HONARVAR, Fatemeh *et al.* Ursolic Acid Enhances Myelin Repair in Adult Mice Brains and Stimulates Exhausted Oligodendrocyte Progenitors to Remyelinate. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 10, p. 2081–2093, 1 out. 2022.

HUANG, Yuan *et al.* Host-guest interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with isomeric ursolic acid and oleanolic acid: physicochemical characterization and molecular modeling study. **Journal of Biomedical Research**, v. 31, n. 5, p. 395–407, 2017.

HUNTEMANN, Niklas *et al.* An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 367, p. 109443, 1 fev. 2022.

IAVICOLI, Ivo *et al.* Effects of Sub-Acute Exposure to Rhodium (as Rh (III) chloride hydrate) on Cytokines in Female Wistar Rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 686–692, set. 2012.

IAVICOLI, Ivo *et al.* The effects of rhodium on the renal function of female Wistar rats. **Chemosphere**, v. 104, p. 120–125, jun. 2014.

INOUE, Yutaka *et al.* Inclusion complexes of Ursolic acid with Cyclodextrin-based metal-organic Framework-1 enhance its solubility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 89, p. 104986, 1 nov. 2023.

ISO. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** GenevalISO, , 2009. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/36406.html>>

JACOB, Shery; NAIR, Anoop B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug Development Research**, v. 79, n. 5, p. 201–217, ago. 2018.

JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356–362, fev. 2016.

JANA, Malabendu *et al.* Induction of IL-2 by interleukin-12 p40 homodimer and IL-12, but not IL-23, in microglia and macrophages: Implications for multiple sclerosis. **Cytokine**, v. 174, p. 156457, 1 fev. 2024.

JIANG, Zhilong; JIANG, Jack X.; ZHANG, Guang-Xian. Macrophages: A double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology letters**, v. 160, n. 1, p. 17–22, jul. 2014.

KATZ SAND, Ilana. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 3, p. 193–205, jun. 2015.

KHOBragade, Prachi P. et al. Multi-Purpose Cyclodextrin Metal-Complexes: Physicochemical and Theoretical Portfolio in Drug Domain. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 14, n. 01, p. 1121–1136, 25 jan. 2024.

KOCH-HENRIKSEN, Nils; MAGYARI, Melinda. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 11, p. 676–688, nov. 2021.

KORIEM, Khaled Mohamed Mohamed. Multiple sclerosis: New insights and trends. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 429–440, maio 2016.

LAZIBAT, Ines. Multiple Sclerosis: New Aspects of Immunopathogenesis. **Acta Clinica Croatica**, v. 57, n. 2, 2018.

LEI, Pan et al. Ursolic Acid Alleviates Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage by Mediating Microglial Pyroptosis via the NF-κB/NLRP3/GSDMD Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14771, 30 set. 2023.

LIU, Guanhui et al. Ursolic acid: biological functions and application in animal husbandry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1251248, 25 out. 2023.

LIY, Pan M. et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 22, p. 2399–2406, 1 nov. 2021.

LOFTSSON, Thorsteinn et al. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335–351, 1 mar. 2005.

LORETO, Domenico; MERLINO, Antonello. The interaction of rhodium compounds with proteins: A structural overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 442, p. 213999, set. 2021.

LUBLIN, Fred D. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, n. 3, p. 278–286, 15 jul. 2014.

LUCHICCHI, Antonio; PREZIOSA, Paolo; 'T HART, Bert. Editorial: "Inside-Out" vs "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, 1 mar. 2021.

LV, Pin et al. Structural analysis and cytotoxicity of host-guest inclusion complexes of cannabidiol with three native cyclodextrins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 337–344, jun. 2019.

MACHADO, Keyla Liana bezerra *et al.* TRATAMENTO E MEDICAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA | Revista CPAQV - Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida. 18 jun. 2024.

MAN, Mao-Qiang *et al.* Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p. 949–964, 1 jun. 2022.

MATASSOLI, Flávio Lemos *et al.* Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Reduces Inflammatory Signaling from Monocytes: Possible Implications for Suppression of HIV Chronic Immune Activation. **mSphere**, v. 3, n. 6, p. 10.1128/msphere.00497-18, 7 nov. 2018.

MCCONNELL, Jeanette R. *et al.* A Potential Rhodium Cancer Therapy: Studies of a Cytotoxic Organorhodium (I) Complex that Binds DNA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 9, p. 2527–2531, 1 maio 2013.

MCGINLEY, Aoife M. *et al.* Th17 cells, γδ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 97–108, fev. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório de Recomendação: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla.** [S.I.]: Ministério da Saúde, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Conjunta SAES/SECTICS nº 08, de 12 de setembro de 2024. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla (EM). Portaria Conjunta nº 08**, 12 set. 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt>>

MOGHADDAM, Vahid Kazemi *et al.* Socioeconomic determinants of global distribution of multiple sclerosis: an ecological investigation based on Global Burden of Disease data. **BMC Neurology**, v. 21, n. 1, p. 145, 1 abr. 2021.

MONTALBAN, Xavier *et al.* ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 2, p. 96–120, 2018.

MOURA, Julia Araújo de *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: An updated systematic review with meta-analysis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 249, p. 108741, 1 fev. 2025.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. **Atlas of MS 2020: Part 1: Mapping multiple sclerosis around the world – Key epidemiology findings:** Atlas of MS. London: Multiple Sclerosis International Federation, 2020. Disponível em: <<https://www.msif.org/resource/atlas-of-ms-2020/>>. Acesso em: 24 set. 2025.

NASCIMENTO, Sinvalda Duda *et al.* OS TRATAMENTOS FARMACOLÓGICO DISPONIBILIZADOS NO BRASIL PARA OS PORTADORES DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: REVISÃO INTEGRATIVA. In: OPEN SCIENCE RESEARCH XI. Anais... Editora Científica Digital, 2023. Disponível em: <<http://www.editoracientifica.com.br/artigos/os-tratamentos-farmacologico-disponibilizados-no-brasil-para-os-portadores-da-escleroze-multipla-revisao-integrativa>>. Acesso em: 1 jun. 2025

NICHOLAS, Jacqueline *et al.* Real-world cost of treatment for multiple sclerosis patients initiating and receiving infused disease-modifying therapies per recommended label in the United States. **Journal of Medical Economics**, v. 23, n. 8, p. 885–893, 2 ago. 2020.

ODULARU, Ayodele T. *et al.* Developments in Platinum-Group Metals as Dual Antibacterial and Anticancer Agents. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–18, 6 nov. 2019.

OHATA, Jun; BALL, Zachary T. Rhodium at the chemistry–biology interface. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 42, p. 14855–14860, 2018.

OLIVEIRA, Julia Cristina de *et al.* Esclerose múltipla: fisiopatologia, diagnóstico, tratamentos e impacto na qualidade de vida. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 4, p. e72161–e72161, 23 ago. 2024.

OPREAN, Camelia *et al.* Improvement of ursolic and oleanolic acids' antitumor activity by complexation with hydrophilic cyclodextrins. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 83, p. 1095–1104, out. 2016.

PANT, Anudeep B. *et al.* Alteration of CD39+Foxp3+ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 303, p. 22–30, 15 fev. 2017.

PATNAIK, Pradyot. **Handbook of inorganic chemicals**. New York: McGraw-Hill, 2003.

PAUL, Anu; COMABELLA, Manuel; GANDHI, Roopali. Biomarkers in Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 3, p. a029058, mar. 2019.

PETITJEAN, Max; GARCÍA-ZUBIRI, Iñigo X.; ISASI, José Ramón. History of cyclodextrin-based polymers in food and pharmacy: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 3465–3476, ago. 2021.

PIRONI, Andressa Maria *et al.* Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Ursolic Acid: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 86–93, 2 jan. 2018.

POLMAN, Chris H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 292–302, fev. 2011.

POPIELEC, Agnieszka; LOFTSSON, Thorsteinn. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 532–542, 15 out. 2017.

PRATT, Dawn Y. et al. Preparation and sorption studies of  $\beta$ -cyclodextrin/epichlorohydrin copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2982–2989, 2010.

PROCHOWICZ, Daniel; KORNOWICZ, Arkadiusz; LEWIŃSKI, Janusz. Interactions of Native Cyclodextrins with Metal Ions and Inorganic Nanoparticles: Fertile Landscape for Chemistry and Materials Science. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 22, p. 13461–13501, 22 nov. 2017.

PRUCHNIK, Florian P.; BIEŃ, Małgorzata; LACHOWICZ, Tadeusz. Properties of Binuclear Rhodium(II) Complexes and Their Antibacterial Activity. **Metal-Based Drugs**, v. 3, n. 4, p. 185–195, 1996.

PUBCHEM. **Rhodium**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23948>>. Acesso em: 8 set. 2025.

QIAN, Zhen et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis from 1990 to 2019: Findings of global burden of disease study 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 17 fev. 2023.

QUAN, Peng et al. The effects of water-soluble polymers on hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin solubilization of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 181–188, 1 fev. 2009.

RAI, Sachchida Nand et al. Anti-inflammatory Activity of Ursolic Acid in MPTP-Induced Parkinsonian Mouse Model. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 3, p. 452–462, out. 2019.

RAMOS-HRYB, Ana B. et al. Therapeutic Potential of Ursolic Acid to Manage Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. **CNS Drugs**, v. 31, n. 12, p. 1029–1041, dez. 2017.

RENARD, E. et al. Preparation and characterization of water soluble high molecular weight  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. **European Polymer Journal**, v. 33, n. 1, p. 49–57, 1 jan. 1997.

ŘEZANKA, Michal. Synthesis of substituted cyclodextrins. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 49–63, 1 mar. 2019.

ROBAT-JAZI, Behrouz *et al.* Immunoregulatory Effect of Calcitriol on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mice. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 22, n. 5, p. 452–467, 29 out. 2023.

RODRÍGUEZ MURÚA, Sofía; FAREZ, Mauricio F.; QUINTANA, Francisco J. The Immune Response in Multiple Sclerosis. **Annual Review of Pathology**, v. 17, p. 121–139, 24 jan. 2022.

SALAU, Veronica F. *et al.* Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An *ex vivo* study. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 2, fev. 2021.

SAMJOO, Imtiaz A. *et al.* Efficacy classification of modern therapies in multiple sclerosis. **Journal of Comparative Effectiveness Research**, v. 10, n. 6, p. 495–507, abr. 2021.

SANTAMARIA, Pere; HACKETT, Peter. **Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease**. 1. ed. [S.l.: S.n.]

SAOKHAM, Phennapha *et al.* Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1161, maio 2018.

SCHERRER, Elaine C. *et al.* Ursolic Acid Derivatives Down Regulate Inflammatory Mediators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 1250–1261, 25 ago. 2023.

SEN, Monokesh K. *et al.* Revisiting the Pathoetiology of Multiple Sclerosis: Has the Tail Been Wagging the Mouse? **Frontiers in Immunology**, v. 11, 29 set. 2020.

SEO, Dae Yun *et al.* Ursolic acid in health and disease. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 235, 2018.

SHARMA, Rakhi *et al.* Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 2, p. 223–236, 2010.

SHEN, Chaoyi *et al.* Chitosan/PCL nanofibrous films developed by SBS to encapsulate thymol/HP $\beta$ CD inclusion complexes for fruit packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, p. 119267, 15 jun. 2022.

ŚLADOWSKA, Katarzyna *et al.* Comparative safety of high-efficacy disease-modifying therapies in relapsing–remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. **Neurological Sciences**, v. 43, n. 9, p. 5479–5500, set. 2022.

SOHRABI, Marzieh *et al.* Recent advances in biological activities of rhodium complexes: Their applications in drug discovery research. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113308, 15 abr. 2021.

SOICA, Codruța *et al.* The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acids in complex with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 4, p. 4924–4940, 17 abr. 2014.

SONG, Shuang *et al.* Binding behavior, water solubility and *in vitro* cytotoxicity of inclusion complexes between ursolic acid and amino-appended  $\beta$ -cyclodextrins. **Journal of Molecular Liquids**, v. 296, p. 111993, 15 dez. 2019.

SONG, Yilin; YOU, Qing; CHEN, Xiaoyuan. Transition Metal-Based Therapies for Inflammatory Diseases. **Advanced Materials**, v. 35, n. 39, p. 2212102, 2023.

STAYKOVA, Maria; BRUESTLE, Anne. Nitric oxide and experimental autoimmune encephalomyelitis review. **Journal of Neuroimmunology**, v. 404, p. 578586, 15 jul. 2025.

STEINBACH, Karin; MERKLER, Doron. Neuropathological Techniques to Investigate CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1304, p. 189–209, 2016.

STIMMER, Lev; FOVET, Claire-Maëlle; SERGUERA, Ché. Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 1, p. 27–41, 1 jan. 2018.

SUN, Qiang *et al.* Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104735, nov. 2020.

TITUS, Haley E. *et al.* Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 27 out. 2020.

TRUZZI, Eleonora *et al.* Nasal biocompatible powder of Geraniol oil complexed with cyclodextrins for neurodegenerative diseases: physicochemical characterization and *in vivo* evidences of nose to brain delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 335, p. 191–202, 10 jul. 2021.

UPADHYE, Mohit *et al.* Myelin-reactive CD8+ T cells influence conventional dendritic cell subsets towards a mature and regulatory phenotype in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 22, n. 1, p. 54, 28 fev. 2025.

VECSERNYÉS, Miklós *et al.* Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. **Archives of Medical Research**, Special Issue: Blood-Brain Barrier in Neurological Diseases. v. 45, n. 8, p. 711–729, 1 nov. 2014.

VENTURINI, Cristina De Garcia *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VESZELKA, Szilvia *et al.* Effects of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Cultured Brain Endothelial Cells. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7738, jan. 2022.

VISWANATHAN, L. G. *et al.* Exploring the role of the IL-12/IFN- $\gamma$  immune axis in subacute sclerosing panencephalitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 400, p. 578532, 15 mar. 2025.

VOSKUHL, Rhonda R.; MACKENZIE-GRAHAM, Allan. Chronic experimental autoimmune encephalomyelitis is an excellent model to study neuroaxonal degeneration in multiple sclerosis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, 19 out. 2022.

VUKIC, Milena D. *et al.* Effect of  $\beta$ -cyclodextrin encapsulation on cytotoxic activity of acetylshikonin against HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 1, p. 136–146, 1 jan. 2020.

WALTON, Clare *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 1 dez. 2020.

WEI, Weipeng *et al.* Progress in the Application of Drugs for the Treatment of Multiple Sclerosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 724718, 13 jul. 2021.

WEI, Xiaojie; YU, Cui-Yun; WEI, Hua. Application of Cyclodextrin for Cancer Immunotherapy. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5610, 24 jul. 2023.

XING, Yuan; MENG, Bohan; CHEN, Qi. Cyclodextrin-Containing Drug Delivery Systems and Their Applications in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 19, p. 10834, jan. 2024.

XU, Tao *et al.* Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR $\gamma$ t Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22707–22710, jul. 2011.

YANG, Lei *et al.* Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 319–325, 1 maio 2012.

ZAFAR, Sameen *et al.* Ursolic acid: a natural modulator of signaling networks in different cancers. **Cancer Cell International**, v. 22, p. 399, 10 dez. 2022.

ŽALOUDKOVÁ, Lenka *et al.* Different Forms of Ursolic Acid and Their Effect on Liver Regeneration. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2020, p. 4074068, 26 jul. 2020.

ZHANG, Yuan *et al.* A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 16, p. 9082–9093, 21 abr. 2020.

ZHENG, Yue *et al.* Reactive oxygen/nitrogen species scavenging and inflammatory regulation by renal-targeted bio-inspired rhodium nanozymes for acute kidney injury theranostics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 662, p. 413–425, 15 maio 2024.

ZHONG, Hanyi *et al.* Formulation and evaluation of  $\beta$ -cyclodextrin polymer microspheres for improved HTHP filtration control in water-based drilling fluids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113549, set. 2020.

ZIMMER, Sebastian *et al.* Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 333, p. 333ra50–333ra50, 6 abr. 2016.

ZONG, Wei; BI, Su Mei. The Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Ursolic Acid with  $\gamma$ -Cyclodextrin. **Advanced Materials Research**, v. 403–408, p. 712–716, 2012.

ALFEI, Silvana; SCHITO, Anna Maria; ZUCCARI, Guendalina. Considerable Improvement of Ursolic Acid Water Solubility by Its Encapsulation in Dendrimer Nanoparticles: Design, Synthesis and Physicochemical Characterization. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2196, ago. 2021.

APPLETON, Silvia Lucia et al. Cyclodextrins as Anti-inflammatory Agents: Basis, Drugs and Perspectives. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1384, set. 2021.

ATTFIELD, Kathrine E. *et al.* The immunology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 12, p. 734–750, dez. 2022.

BANKS, W. A. *et al.* Modest Blood-Brain Barrier Permeability of the Cyclodextrin Kleptose: Modification by Efflux and Luminal Surface Binding. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 371, n. 1, p. 121–129, out. 2019.

BEBO, Bruce et al. The Economic Burden of Multiple Sclerosis in the United States. **Neurology**, v. 98, n. 18, p. e1810–e1817, maio 2022.

BERARD, Jennifer L. *et al.* Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Glia**, v. 58, n. 4, p. 434–445, mar. 2010.

BIEŃ, M. *et al.* Studies of antibacterial activity of binuclear rhodium (II) complexes with heterocyclic nitrogen ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 73, n. 1–2, p. 49–55, 1999.

BIERHANSL, Laura et al. Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 578–600, ago. 2022.

BITTENCOURT, Vanessa C. E. et al. Nanostructured Insecticide Composition through the Incorporation of Natural Abamectin in  $\beta$ -Cyclodextrin: Activity against Aedes aegypti Larvae. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 2023–2032, 2021.

BITTNER, Stefan et al. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 86, p. 51275, abr. 2014.

BORDIGNON, Valentina et al. Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. **BMC immunology**, v. 9, p. 19, maio 2008.

BOSCOLO, Paolo et al. Different Effects of Platinum, Palladium, and Rhodium Salts on Lymphocyte Proliferation and Cytokine Release. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 34, n. 3, p. 299–306, jan. 2004.

BRAGA, Susana Santos. Molecular Mind Games: The Medicinal Action of Cyclodextrins in Neurodegenerative Diseases. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 666, abr. 2023.

BURMAN, Joachim. Delaying the inevitable: Are disease modifying drugs for progressive MS worthwhile? **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 54, p. 103134, set. 2021.

CALLEGARI, Ilaria; DERFUSS, Tobias; GALLI, Edoardo. Update on treatment in multiple sclerosis. **Presse Medicale (Paris, France: 1983)**, v. 50, n. 2, p. 104068, jun. 2021.

CAMARGO, Fernando et al. Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. **Life Sciences**, v. 70, n. 2, p. 131–142, nov. 2001.

CARVALHO, Paloma E. et al. Evaluation of the Immunomodulatory Potential of Rhodium(III) Complexes with Cyclodextrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 7, p. e-20250062, maio 2025.

CASTRO, Sandra B. R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- $\alpha$  in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 3, p. 347–352, mar. 2012.

CHATAWAY, Jeremy et al. Secondary progressive multiple sclerosis: a systematic review of costs and health state utilities. **Current Medical Research and Opinion**, v. 37, n. 6, p. 995–1004, jun. 2021.

CHEMSPIDER. Rhodium(3+) chloride hydrate (1:3:3). Disponível em: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.140401.html>. Acesso em: 8 set. 2025.

CHENG, Yun et al. Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 10, p. 1973–1983, out. 2017.

CHU, F. et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice via blockading NF-κB pathway. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 204, n. 2, p. 199–211, maio 2021.

CID-SAMAMED, Antonio et al. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132467, ago. 2022.

CMED. **PREÇO FÁBRICA - PF (PREÇO PARA LABORATÓRIOS E DISTRIBUIDORES) PREÇO MÁXIMO AO CONSUMIDOR - PMC (PREÇO PARA FARMÁCIAS E DROGARIAS)**. [S. I.: s. n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos medicamentos/cmed/precos>.

CONSTANTINESCU, Cris S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, out. 2011.

CZERCZAK, Slawomir et al. Nickel, Ruthenium, Rhodium, Palladium, Osmium, and Platinum. In: **Patty's Toxicology**. 6. ed. [S. I.]: Eula Bingham e Barbara Cohsen, 2012. v. 1.

DA SILVA JÚNIOR, Walter Ferreira et al. Inclusion Complexes of β and HPβ-Cyclodextrin with α, β Amyrin and In Vitro Anti-Inflammatory Activity. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 241, jun. 2019.

DA SILVA, Nilceia Lopes et al. Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study. **BMC Health Services Research**, v. 16, p. 102, mar. 2016.

DARGAHI, Narges et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain Sciences**, v. 7, n. 7, p. 78, jul. 2017.

DE PAULA, Marcio L. et al. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1291–1297, set. 2008.

DI CAGNO, Massimiliano. The Potential of Cyclodextrins as Novel Active Pharmaceutical Ingredients: A Short Overview. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1, dez. 2016.

DÍAZ, Cindy; ZARCO, Luis Alfonso; RIVERA, Diego M. Highly active multiple sclerosis: An update. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 30, p. 215–224, maio 2019.

DINIZ, Isabela Maia. Esclerose Múltipla: gastos em medicamentos do componente especializado, serviços ambulatoriais e hospitalares em uma coorte de dezesseis anos. **2017**. (Nota: Esta referência parece ser uma tese ou dissertação e está incompleta segundo a norma, faltando tipo de trabalho, instituição, etc.)

DINIZ, Isabela Maia et al. The long-term costs for treating multiple sclerosis in a 16-year retrospective cohort study in Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0199446, jun. 2018.

DOAN, Anh Thi Ngoc; KOJIMA, Natsuki; SAKURAI, Kazuo. Reduced nephrotoxicity of epichlorohydrin-crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles ( $\beta$ CDNPs) and its enhanced binding with hydrophobic compounds. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 39, n. 6, p. 522–535, nov. 2024.

DOS SANTOS MOREIRA, Ana M. et al. Hydrophobic Nanoprecipitates of  $\beta$ -Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against Aedes aegypti Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7275–7285, jul. 2018.

DUAN, Haoyang et al. Rehabilitation treatment of multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1168821, abr. 2023.

ELLEN, Olivia et al. The Heterogeneous Multiple Sclerosis Lesion: How Can We Assess and Modify a Degenerating Lesion? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11112, jan. 2023.

FEITO, M. J. et al. Response of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 208, p. 112110, dez. 2021.

FENG, Yan et al. A review of controlled release from cyclodextrins: release methods, release systems and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 20, p. 4744–4756, ago. 2023.

GHOLAMZAD, Mehrdad et al. A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. **Inflammation Research**, v. 68, n. 1, p. 25–38, jan. 2019.

GOMBOLAY, Grace et al. Worldwide epidemiology of paediatric multiple sclerosis: data from the Multiple Sclerosis International Federation Atlas of MS, third edition. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 96, n. 8, p. 814–820, ago. 2025.

- GOSWAMI, Sathi; SARKAR, Munna. Fluorescence, FTIR and 1H NMR studies of the inclusion complexes of the painkiller lornoxicam with  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins and their hydroxy propyl derivatives in aqueous solutions at different pHs and in the solid state. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 18, p. 15146–15156, set. 2018.
- GOVINDARAJAN, Vaidya; DE RIVERO VACCARI, Juan Pablo; KEANE, Robert W. Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 260, dez. 2020.
- GUNAWARDENA, Dhanushka et al. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 910–919, mar. 2015.
- GUO, Yu-Xin et al. Role of Plant-Derived Natural Compounds in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Review of the Treatment Potential and Development Strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 639651, jun. 2021.
- HAKI, Maha et al. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. **Medicine**, v. 103, n. 8, p. e37297, fev. 2024.
- HAUSER, Stephen L.; CREE, Bruce A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 12, p. 1380- 1390.e2, dez. 2020.
- HIGUCHI, Takeru; CONNORS, Kenneth A. Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation. [S. I.: s. n.]. v. 4.
- HONARVAR, Fatemeh et al. Ursolic Acid Enhances Myelin Repair in Adult Mice Brains and Stimulates Exhausted Oligodendrocyte Progenitors to Remyelinate. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 10, p. 2081–2093, out. 2022.
- HUANG, Yuan et al. Host-guest interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with isomeric ursolic acid and oleanolic acid: physicochemical characterization and molecular modeling study. **Journal of Biomedical Research**, v. 31, n. 5, p. 395–407, 2017.
- HUNTEMANN, Niklas et al. An optimized and validated protocol for inducing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 367, p. 109443, fev. 2022.
- IAVICOLI, Ivo et al. Effects of Sub-Acute Exposure to Rhodium (as Rh (III) chloride hydrate) on Cytokines in Female Wistar Rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 686–692, set. 2012.
- IAVICOLI, Ivo et al. The effects of rhodium on the renal function of female Wistar rats. **Chemosphere**, v. 104, p. 120–125, jun. 2014.

INOUE, Yutaka et al. Inclusion complexes of Ursolic acid with Cyclodextrin-based metal-organic Framework-1 enhance its solubility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 89, p. 104986, nov. 2023.

ISO. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneva: ISO**, 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html>.

JACOB, Shery; NAIR, Anoop B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug Development Research**, v. 79, n. 5, p. 201–217, ago. 2018.

JAMBHEKAR, Sunil S.; BREEN, Philip. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356–362, fev. 2016.

JANA, Malabendu et al. Induction of IL-2 by interleukin-12 p40 homodimer and IL-12, but not IL-23, in microglia and macrophages: Implications for multiple sclerosis. **Cytokine**, v. 174, p. 156457, fev. 2024.

KATZ SAND, Ilana. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 3, p. 193–205, jun. 2015.

KHOBragade, Prachi P. et al. Multi-Purpose Cyclodextrin Metal-Complexes: Physicochemical and Theoretical Portfolio in Drug Domain. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 14, n. 01, p. 1121–1136, jan. 2024.

KOCH-HENRIKSEN, Nils; MAGYARI, Melinda. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 11, p. 676–688, nov. 2021.

KORIEM, Khaled Mohamed Mohamed. Multiple sclerosis: New insights and trends. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 429–440, maio 2016.

LAZIBAT, Ines. Multiple Sclerosis: New Aspects of Immunopathogenesis. **Acta Clinica Croatica**, v. 57, n. 2, 2018.

LEI, Pan et al. Ursolic Acid Alleviates Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage by Mediating Microglial Pyroptosis via the NF-κB/NLRP3/GSDMD Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14771, set. 2023.

LIU, Guanhui et al. Ursolic acid: biological functions and application in animal husbandry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1251248, out. 2023.

LIY, Pan M. et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 22, p. 2399–2406, nov. 2021.

LOFTSSON, Thorsteinn et al. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335–351, mar. 2005.

LORETO, Domenico; MERLINO, Antonello. The interaction of rhodium compounds with proteins: A structural overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 442, p. 213999, set. 2021.

LUBLIN, Fred D. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, n. 3, p. 278–286, jul. 2014.

LUCHICCHI, Antonio; PREZIOSA, Paolo; 'T HART, Bert. Editorial: “Inside-Out” vs “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, mar. 2021.

LV, Pin et al. Structural analysis and cytotoxicity of host-guest inclusion complexes of cannabidiol with three native cyclodextrins. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 337–344, jun. 2019.

MACHADO, Keyla Liana bezerra et al. TRATAMENTO E MEDICAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA | Revista CPAQV - Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida. **18 jun. 2024**.

MAN, Mao-Qiang et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p. 949–964, jun. 2022.

MATASSOLI, Flávio Lemos et al. Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Reduces Inflammatory Signaling from Monocytes: Possible Implications for Suppression of HIV Chronic Immune Activation. **mSphere**, v. 3, n. 6, p. 10.1128/msphere.00497-18, nov. 2018.

MCCONNELL, Jeanette R. et al. A Potential Rhodium Cancer Therapy: Studies of a Cytotoxic Organorhodium (I) Complex that Binds DNA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 9, p. 2527–2531, maio 2013.

MCGINLEY, Aoife M. et al. Th17 cells, γδ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 97–108, fev. 2018.

MOGHADDAM, Vahid Kazemi et al. Socioeconomic determinants of global distribution of multiple sclerosis: an ecological investigation based on Global Burden of Disease data. **BMC Neurology**, v. 21, n. 1, p. 145, abr. 2021.

MONTALBAN, Xavier et al. ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 24, n. 2, p. 96–120, 2018.

MOURA, Julia Araújo de et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: An updated systematic review with meta-analysis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 249, p. 108741, fev. 2025.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. *Atlas of MS 2020: Part 1: Mapping multiple sclerosis around the world – Key epidemiology findings: Atlas of MS*. London: Multiple Sclerosis International Federation, 2020. Disponível em: <https://www.msif.org/resource/atlas-of-ms-2020/>. Acesso em: 24 set. 2025.

NASCIMENTO, Sinvalda Duda et al. OS TRATAMENTOS FARMACOLÓGICO DISPONIBILIZADOS NO BRASIL PARA OS PORTADORES DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: REVISÃO INTEGRATIVA. In: OPEN SCIENCE RESEARCH XI. **Anais...** Editora Científica Digital, 2023. Disponível em: <http://www.editoracientifica.com.br/artigos/os-tratamentos-farmacologico-disponibilizados-no-brasil-para-os-portadores-da-esclerose-multipla-revisao-integrativa>. Acesso em: 1 jun. 2025.

NICHOLAS, Jacqueline et al. Real-world cost of treatment for multiple sclerosis patients initiating and receiving infused disease-modifying therapies per recommended label in the United States. **Journal of Medical Economics**, v. 23, n. 8, p. 885–893, **ago.** 2020.

ODULARU, Ayodele T. et al. Developments in Platinum-Group Metals as Dual Antibacterial and Anticancer Agents. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–18, **nov.** 2019.

OHATA, Jun; BALL, Zachary T. Rhodium at the chemistry–biology interface. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 42, p. 14855–14860, 2018.

OLIVEIRA, Julia Cristina de et al. Esclerose múltipla: fisiopatologia, diagnóstico, tratamentos e impacto na qualidade de vida. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 4, p. e72161–e72161, **ago.** 2024.

OPREAN, Camelia et al. Improvement of ursolic and oleanolic acids' antitumor activity by complexation with hydrophilic cyclodextrins. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 83, p. 1095–1104, out. 2016.

PANT, Anudeep B. et al. Alteration of CD39+Foxp3+ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 303, p. 22–30, **fev.** 2017.

PATNAIK, Pradyot. *Handbook of inorganic chemicals*. New York: McGraw-Hill, 2003.

PAUL, Anu; COMABELLA, Manuel; GANDHI, Roopali. Biomarkers in Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 3, p. a029058, mar. 2019.

PETITJEAN, Max; GARCÍA-ZUBIRI, Iñigo X.; ISASI, José Ramón. History of cyclodextrin-based polymers in food and pharmacy: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 3465–3476, **ago.** 2021.

PIRONI, Andressa Maria et al. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Ursolic Acid: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 86–93, jan. 2018.

POLMAN, Chris H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 292–302, fev. 2011.

POPIELEC, Agnieszka; LOFTSSON, Thorsteinn. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 532–542, out. 2017.

PRATT, Dawn Y. et al. Preparation and sorption studies of  $\beta$ -cyclodextrin/epichlorohydrin copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, n. 5, p. 2982–2989, 2010.

PROCHOWICZ, Daniel; KORNOWICZ, Arkadiusz; LEWIŃSKI, Janusz. Interactions of Native Cyclodextrins with Metal Ions and Inorganic Nanoparticles: Fertile Landscape for Chemistry and Materials Science. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 22, p. 13461–13501, nov. 2017.

PRUCHNIK, Florian P.; BIEŃ, Małgorzata; LACHOWICZ, Tadeusz. Properties of Binuclear Rhodium(II) Complexes and Their Antibacterial Activity. **Metal-Based Drugs**, v. 3, n. 4, p. 185–195, 1996.

PUBCHEM. Rhodium. Disponível em:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23948>. Acesso em: 8 set. 2025.

QIAN, Zhen et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis from 1990 to 2019: Findings of global burden of disease study 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, fev. 2023.

QUAN, Peng et al. The effects of water-soluble polymers on hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin solubilization of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 181–188, fev. 2009.

RAI, Sachchida Nand et al. Anti-inflammatory Activity of Ursolic Acid in MPTP-Induced Parkinsonian Mouse Model. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 3, p. 452–462, out. 2019.

RAMOS-HRYB, Ana B. et al. Therapeutic Potential of Ursolic Acid to Manage Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. **CNS Drugs**, v. 31, n. 12, p. 1029–1041, dez. 2017.

RENARD, E. et al. Preparation and characterization of water soluble high molecular weight  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. **European Polymer Journal**, v. 33, n. 1, p. 49–57, jan. 1997.

ŘEZANKA, Michal. Synthesis of substituted cyclodextrins. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 49–63, **mar.** 2019.

ROBAT-JAZI, Behrouz et al. Immunoregulatory Effect of Calcitriol on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mice. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 22, n. 5, p. 452–467, **out.** 2023.

RODRÍGUEZ MURÚA, Sofía; FAREZ, Mauricio F.; QUINTANA, Francisco J. The Immune Response in Multiple Sclerosis. **Annual Review of Pathology**, v. 17, p. 121–139, **jan.** 2022.

SALAU, Veronica F. et al. Modulatory effect of ursolic acid on neurodegenerative activities in oxidative brain injury: An ex vivo study. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 2, fev. 2021.

SAMJOO, Imtiaz A. et al. Efficacy classification of modern therapies in multiple sclerosis. **Journal of Comparative Effectiveness Research**, v. 10, n. 6, p. 495–507, **abr.** 2021.

SANTAMARIA, Pere; HACKETT, Peter. Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease. 1. ed. [S. I.: s. n.]

SAOKHAM, Phennapha et al. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1161, maio 2018.

SCHERRER, Elaine C. et al. Ursolic Acid Derivatives Down Regulate Inflammatory Mediators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 1250–1261, **ago.** 2023.

SEO, Dae Yun et al. Ursolic acid in health and disease. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 235, 2018.

SHARMA, Rakhi et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 2, p. 223–236, 2010.

SHEN, Chaoyi et al. Chitosan/PCL nanofibrous films developed by SBS to encapsulate thymol/HP $\beta$ CD inclusion complexes for fruit packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, p. 119267, **jun.** 2022.

ŚLADOWSKA, Katarzyna et al. Comparative safety of high-efficacy disease-modifying therapies in relapsing–remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. **Neurological Sciences**, v. 43, n. 9, p. 5479–5500, **set.** 2022.

SOHRABI, Marzieh et al. Recent advances in biological activities of rhodium complexes: Their applications in drug discovery research. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113308, **abr.** 2021.

SOICA, Codruța et al. The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acids in complex with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 4, p. 4924–4940, abr. 2014.

SONG, Shuang et al. Binding behavior, water solubility and in vitro cytotoxicity of inclusion complexes between ursolic acid and amino-appended  $\beta$ -cyclodextrins. **Journal of Molecular Liquids**, v. 296, p. 111993, dez. 2019.

SONG, Yilin; YOU, Qing; CHEN, Xiaoyuan. Transition Metal-Based Therapies for Inflammatory Diseases. **Advanced Materials**, v. 35, n. 39, p. 2212102, 2023.

STAYKOVA, Maria; BRUESTLE, Anne. Nitric oxide and experimental autoimmune encephalomyelitis review. **Journal of Neuroimmunology**, v. 404, p. 578586, jul. 2025.

STEINBACH, Karin; MERKLER, Doron. Neuropathological Techniques to Investigate CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1304, p. 189–209, 2016.

STIMMER, Lev; FOVET, Claire-Maëlle; SERGUERA, Ché. Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 1, p. 27–41, jan. 2018.

SUN, Qiang et al. Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104735, nov. 2020.

TITUS, Haley E. et al. Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, out. 2020.

TRUZZI, Eleonora et al. Nasal biocompatible powder of Geraniol oil complexed with cyclodextrins for neurodegenerative diseases: physicochemical characterization and in vivo evidences of nose to brain delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 335, p. 191–202, jul. 2021.

UPADHYE, Mohit et al. Myelin-reactive CD8+ T cells influence conventional dendritic cell subsets towards a mature and regulatory phenotype in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 22, n. 1, p. 54, fev. 2025.

VECSERNYÉS, Miklós et al. Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. **Archives of Medical Research**, Specia Issue: Blood-Brain Barrier in Neurological Diseases. v. 45, n. 8, p. 711–729, nov. 2014.

VENTURINI, Cristina De Garcia et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VESZELKA, Szilvia et al. Effects of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Cultured Brain Endothelial Cells. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7738, jan. 2022.

VISWANATHAN, L. G. et al. Exploring the role of the IL-12/IFN- $\gamma$  immune axis in subacute sclerosing panencephalitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 400, p. 578532, mar. 2025.

VOSKUHL, Rhonda R.; MACKENZIE-GRAHAM, Allan. Chronic experimental autoimmune encephalomyelitis is an excellent model to study neuroaxonal degeneration in multiple sclerosis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, out. 2022.

VUKIC, Milena D. et al. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin encapsulation on cytotoxic activity of acetylshikonin against HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 1, p. 136–146, jan. 2020.

WALTON, Clare et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, dez. 2020.

WEI, Weipeng et al. Progress in the Application of Drugs for the Treatment of Multiple Sclerosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 724718, jul. 2021.

WEI, Xiaojie; YU, Cui-Yun; WEI, Hua. Application of Cyclodextrin for Cancer Immunotherapy. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5610, jul. 2023.

XING, Yuan; MENG, Bohan; CHEN, Qi. Cyclodextrin-Containing Drug Delivery Systems and Their Applications in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 19, p. 10834, jan. 2024.

XU, Tao et al. Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR $\gamma$ t Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22707–22710, jul. 2011.

YANG, Lei et al. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 319–325, maio 2012.

ZAFAR, Sameen et al. Ursolic acid: a natural modulator of signaling networks in different cancers. **Cancer Cell International**, v. 22, p. 399, dez. 2022.

ŽALOUDKOVÁ, Lenka et al. Different Forms of Ursolic Acid and Their Effect on Liver Regeneration. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2020, p. 4074068, jul. 2020.

ZHANG, Yuan et al. A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 16, p. 9082–9093, abr. 2020.

ZHENG, Yue et al. Reactive oxygen/nitrogen species scavenging and inflammatory regulation by renal-targeted bio-inspired rhodium nanozymes for acute kidney injury theranostics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 662, p. 413–425, maio 2024.

ZHONG, Hanyi et al. Formulation and evaluation of  $\beta$ -cyclodextrin polymer microspheres for improved HTHP filtration control in water-based drilling fluids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113549, set. 2020.

ZIMMER, Sebastian et al. Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 333, p. 333ra50-333ra50, abr. 2016.

ZONG, Wei; BI, Su Mei. The Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Ursolic Acid with  $\gamma$ -Cyclodextrin. **Advanced Materials Research**, v. 403–408, p. 712–716, 2012.

## ANEXO I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA**  
**DIAMANTINA – MG**

### CERTIFICADO

Teófilo Otoni, 1º de setembro de 2023.

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO *in vivo* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE COMPLEXOS DE AU COM CICLODEXTRINAS EM MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL", registrada com o nº 03-2023, sob a responsabilidade de Sandra Bertelli Ribeiro de Castro - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea, e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-Mucuri/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 33ª Reunião Ordinária, no dia 30 de agosto de 2023.

Finalidade	( <input type="checkbox"/> ) Ensino ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/10/2023 a 01/10/2026
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / CS7BL/6
Nº de animais	105
Peso/idade	20g / 4 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Viçosa - UFV

*O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA-Mucuri/UFVJM durante a vigência do projeto.*

*Com o recebimento deste Certificado, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.*

*Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA-Mucuri/UFVJM.*

Ernani Aloysio Amaral

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-Mucuri/UFVJM



Documento assinado eletronicamente por Ernani Aloysio Amaral, Servidor (a), em 01/09/2023, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1180046 e

o código CRC 5F040E4D.



## C E R T I F I C A D O

Teófilo Otoni, 05 de maio de 2021.

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO RÓDIO (III) E DO COMPLEXO DE RÓDIO (III) COM HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA NA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL", registrada com o nº 03-2021, sob a responsabilidade de Caio César de Souza Alves - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-Mucuri DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 19ª Reunião Ordinária, no dia 05 de maio de 2021.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	05/05/2021 a 01/04/2025
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	150
Peso/Idade	21g / 4 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	CEBIO-ICB-UFMG

*Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.*

*Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.*

*Ernani Aloysio Amaral*

Ernani Aloysio Amaral  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM

## ANEXO II - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo 1: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20250156>



### Immunomodulatory Effect of the Ursolic Acid/Poly- $\beta$ -cyclodextrin Complex in an Experimental Model of Multiple Sclerosis

*Maiara R. Salvador,<sup>a</sup> Maria A. G. Carneiro,<sup>b</sup> Jully C. S. Viana,<sup>b</sup> Vitória A. Lopes,<sup>b</sup> Gefferson L. S. Gomes,<sup>b</sup> Oswaldo C. Junior,<sup>b</sup> Mariana A. R. Rezende,<sup>a</sup> Jefferson G. Silva,<sup>a</sup> Eryl G. Azevedo,<sup>a</sup> Alessandra P. Carli,<sup>c</sup> Heder J. Ribeiro,<sup>a</sup> Caio C. S. Alves,<sup>b</sup> Angelo M. L. Denadai<sup>a,b</sup> and Sandra B. R. Castro<sup>a,b</sup>*

<sup>a</sup>*Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
35010-180 Governador Valadares-MG, Brasil*

<sup>b</sup>*Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
39803-371 Teófilo Otoni-MG, Brasil*

<sup>c</sup>*Instituto de Ciência, Engenharia e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
39803-371 Teófilo Otoni-MG, Brasil*

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease that affects the central nervous system, characterized by demyelination and inflammation. Although treatments are available, they have serious adverse effects and are expensive. Ursolic acid (UA) has anti-inflammatory and neuroprotective properties, but its low solubility hinders its application. This study developed and characterized a ursolic acid with poly- $\beta$ -cyclodextrin (UA/p $\beta$ CD) complex and evaluated its immunomodulatory potential *in vitro* and *in vivo*. Fourier transform infrared spectroscopy, thermal analyses, and phase solubility experiments confirmed the complexation. The complex improved UA solubility and thermal stability, reduced cytotoxicity in macrophage cell lines, and decreased nitric oxide production. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model, UA and UA/p $\beta$ CD reduced neurological disability scores, indicating an attenuation of the inflammatory response. The complex group showed lower levels of IL-12p70 in the brain and spinal cord. These results indicate that the UA/p $\beta$ CD complex is a promising strategy for the treatment of MS.

**Keywords:** multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, UA/p $\beta$ CD complex, poly- $\beta$ -cyclodextrin, ursolic acid

### Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic and progressive autoimmune disease that affects the central nervous system (CNS), specifically the brain and spinal cord.<sup>1</sup> It is characterized by the immune-mediated deterioration of myelinated axons, which impairs the transmission of nerve impulses.<sup>2</sup> The pathogenesis of MS involves the activation of autoreactive T-lymphocytes that trigger an inflammatory reaction against autoantigens of the myelin sheath. This demyelination process leads to a series of manifestations, notably motor, sensory, cognitive, and visual, with the potential to cause permanent physical disability.<sup>2</sup> Although the exact etiology is unknown, genetic

and environmental factors are believed to play a role in the disease's development.<sup>1</sup>

It is estimated that nearly 3 million people worldwide live with MS, with an average incidence of 2.1 per 100,000 people per year.<sup>3</sup> Furthermore, there is a higher prevalence in women, with a 2:1 ratio compared to men, and the global average age of diagnosis is 32, a typical age for the economically active population.<sup>4</sup> Consequently, MS is believed to be the leading neurological cause of disability in young adults, with a significant impact on the quality of life of those affected.<sup>4</sup>

The drugs used in MS treatment reduce inflammation and disease progression by inhibiting immune system cells involved in the disease's inflammatory cascade.<sup>5,6</sup> Medications available on the market include interferons, glatiramer acetate, rituximab, ocrelizumab, and alemtuzumab, as well as siponimod for progressive forms

\*e-mail: angelo.denadai@ufjf.br  
Editor handled this article: Breno A. D. Neto (Editor-in-Chief)



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Artigo 3: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20250062>



## Evaluation of the Immunomodulatory Potential of Rhodium(III) Complexes with Cyclodextrins

*Paloma E. Carvalho,<sup>a</sup> Maiara R. Salvador,<sup>a</sup> Bárbara G. R. Fernandes,<sup>a</sup> Cleonice A. Souza,<sup>a</sup> Maria A. G. Carneiro,<sup>b</sup> Roberta M. Cachuba,<sup>b</sup> Bolívar R. Amaro,<sup>a</sup> Alan R. Oliveira,<sup>a</sup> Caio C. S. Alves,<sup>b</sup> Alessandra P. Carli,<sup>b</sup> Jeferson G. da Silva,<sup>a</sup> Ângelo M. L. Denadai<sup>✉,a</sup> and Sandra B. R. Castro<sup>✉,b</sup>*

<sup>a</sup>*Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
35010-180 Governador Valadares-MG, Brazil*

<sup>b</sup>*Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
39803-371 Teófilo Otoni-MG, Brazil*

Rhodium(III) ( $\text{Rh}^{III}$ ) is a metal with potential immunomodulatory and anti-inflammatory activity. In an attempt to improve their biological activities,  $\text{Rh}^{III}$  complexes are being produced. Therefore, this study aimed to evaluate the immunomodulatory potential of  $\text{Rh}^{III}$  and its coordination complexes (CCs) with beta cyclodextrin ( $\beta\text{CD}$ ) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP $\beta\text{CD}$ ). The physicochemical characterization of the complexes has been performed. Immunomodulatory activities were evaluated *in vitro* and *in vivo* in a carrageenan-induced mouse paw edema model. The results confirm the formation of CCs, being endothermic for the  $\beta\text{CD}$  system and exothermic for the HP $\beta\text{CD}$  system. Moreover, the CCs self-assemble into supramolecular structures, as shown by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements.  $\text{Rh}^{III}$  and CCs reduced the nitric oxide production and the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa\text{B}$ ) and reduced the thickness of the paws. The results obtained in the present study demonstrate the immunomodulatory activity and anti-inflammatory potential of  $\text{Rh}^{III}$  and its CCs.

**Keywords:** rhodium, cyclodextrin, coordination complex, inflammation

### Introduction

Inflammation is a defense mechanism mediated by immune system cells in response to infections or cell damage.<sup>1,2</sup> The acute inflammatory response is characterized by the rise in vascular permeability, which is responsible for the extravasation of fluids and proteins, resulting in cellular infiltration and edema.<sup>1,3</sup>

For the immune response to be effective, careful regulation of inflammatory mediators is necessary, as uncontrolled or persistent inflammation can result in host tissue damage and chronic inflammatory diseases.<sup>4,7</sup> In these cases, the use of anti-inflammatory drugs is recommended.<sup>8</sup> However, these drugs have numerous adverse effects, mainly cardiovascular, gastrointestinal, and renal.<sup>9,10</sup> In addition, many chronic inflammatory diseases do not have effective treatments.<sup>11</sup>

Scientific research is therefore being conducted

worldwide to find new therapeutic agents with anti-inflammatory properties associated with fewer side effects and greater accessibility to the population.<sup>8,12</sup> The development of drugs with a mechanism of action centered on inhibiting the synthesis of nitric oxide (NO),<sup>13</sup> pro-inflammatory cytokines,<sup>12,14</sup> and the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa\text{B}$ ),<sup>15</sup> are crucial for controlling inflammatory processes characterized by excessive prolonged production of these mediators.

Recent evidence shows that cyclometalated rhodium(III) ( $\text{Rh}^{III}$ ) complexes exhibit inhibitory activity of the neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8 (NEDD8) enzyme and can modulate the degradation of substrates, such as the inhibitor of the transcription factor kappa B alpha (I $\kappa\text{B}\alpha$ ), which plays a significant role in NF- $\kappa\text{B}$  signaling involved in numerous inflammatory processes.<sup>16</sup> Moreover, it has demonstrated that  $\text{Rh}^{III}$  has specific targeting for the NEDD8-activating enzyme (NAE) enzyme, which plays a crucial role in modulating pathways in the inflammatory process,<sup>17</sup> the main focus of the present study.

<sup>✉</sup>e-mail: angelo.denadai@ufjf.br  
Editor handled this article: Izaura C. N. Diógenes (Executive)



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Artigo 4: <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01591-0>



## Ursolic acid derivatives improved clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating central nervous system inflammation

Elaine Carlos Scherrer<sup>1</sup> · Karla Antunes Ramos<sup>2</sup> · Ydia Mariele Valadares<sup>1</sup> · Igor Gabriel Machado Soares<sup>2</sup> · Alessandra Paula Carli<sup>2</sup> · Fernando Sá Silva<sup>1</sup> · Jefferson Gomes Silva<sup>1</sup> · Daniel Gomes Alvarenga<sup>1</sup> · Alessa Sin Singer Brugiolo<sup>1</sup> · Rodrigo Moreira Verly<sup>3</sup> · Maiara Rodrigues Salvador<sup>1</sup> · Angelo Marcio Leite Denadai<sup>1</sup> · Caio César Souza Alves<sup>2,4</sup> · Sandra Bertelli Ribeiro Castro<sup>2</sup>

Received: 24 August 2024 / Accepted: 20 March 2025 / Published online: 1 April 2025  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2025

### Abstract

The immunopathogenesis of multiple sclerosis (MS) involves the activation of T lymphocytes, leading to progressive axonal loss and brain atrophy. Ursolic acid (AU) has been widely used as an herbal medicine, with the ability to inhibit the production and secretion of cytokines and may influence the differentiation of CD4+ helper cells. In this study, we aimed to investigate the immunomodulatory effects of ursolic acid derivatives (methyl 3β-hydroxyurs-12-en-28-oate (AUD1) and methyl 3β-acetoxyurs-12-en-28-oate (AUD2)) in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). EAE was induced by subcutaneous immunization of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG<sub>35–55</sub>) in C57BL/6 mice. On the 15th day post-induction (dpi), the mice were treated with AU, AUD1, or AUD2 (50 mg/kg intraperitoneally per day) for six days. Clinical signs were monitored until 21 dpi, and parameters were assessed in the spinal cord, lymph nodes, and brain at 21 dpi. The results showed that both derivatives similarly attenuated the clinical signs of EAE and reduced inflammation and demyelination in the spinal cord. In addition, they reduced the number of pro-inflammatory cells in the brain, the level of IL-1β, TNF, and IFN-γ in the spinal cord, and, in the periphery, promoted the regulation of pro-inflammatory cells. In conclusion, regulating cells in the periphery and reducing the number of pro-inflammatory cells in the CNS, with AUD1 and AUD2, culminated in the efficacy of the clinical parameters presented in EAE, suggesting a therapeutic potential for treating MS.

**Keywords** Multiple sclerosis · Treg cells · Antigen-presenting cell · Demyelination · Triterpene

### Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by demyelination, gliosis, and axonal degeneration of the central nervous system (CNS) (Reich et al. 2018). The immunopathogenesis of MS involves the activation of T and B lymphocytes that act against CNS antigens, leading to progressive axonal loss, brain atrophy, and neurological and cognitive impairment (Bierhansl et al. 2022). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has been widely employed to evaluate new strategies for the treatment of MS due to the immunological correlation

between MS and EAE (Constantinescu et al. 2011; Jahan-Abad et al. 2019).

Ursolic acid (AU) is a pentacyclic triterpenoid compound found naturally in fruit peels as well as in various herbs and spices (Kashyap et al. 2016; Seo et al. 2018; Gudoityte et al. 2021). Widely used as an herbal medicine, AU exhibits a broad spectrum of pharmacological activities (Lee et al. 2016; Hussain et al. 2017), notable for its anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Research has shown that AU can inhibit cytokine production and secretion from immune cells, such as T cells, B cells, or macrophages (Ahmad et al. 2006; Checker et al. 2012; Rong et al.

Extended author information available on the last page of the article

## Effect of protease inhibitors from *Siparuna brasiliensis* leaves on experimental autoimmune encephalomyelitis

Gefferson L.S. Gomes<sup>a</sup> · Maiara R. Salvador<sup>b</sup> · Maria Emilia R. Marciel<sup>a</sup> · ... · Nerilson M. Lima<sup>c,d</sup> · Caio César S. Alves<sup>a</sup> · Alessandra P. Carli<sup>a</sup> ... Show more

Affiliations & Notes ▾ Article Info ▾

Get Access

Cite

Share

Set Alert

Get Rights

Reprints

[◀ Previous article](#) [Next article ▶](#)

### » Highlights

- Show Outline
- *S. brasiliensis* inhibitor extract reduced clinical disease scores and demyelination.
  - The protein extract promoted a beneficial immune response by modulating cytokines.
  - Active proteins of 12 and 15 kDa related to Bowman-Birk inhibitors were identified.
  - Protease inhibitor extracts showed neuroprotective and immunomodulatory effects.

### » Objetivo

Show Outline

Protease inhibitors have emerged as promising candidates for modulating autoimmune diseases. This study evaluates the pharmacological potential of protease inhibitors extracted from leaves of *Siparuna brasiliensis* in an experimental autoimmune encephalomyelitis model, a preclinical model of multiple sclerosis.

### Methods

Female C57BL/6 mice were immunized with the MOG35–55 peptide to induce EAE. The mice were then divided into groups and treated with either PBS or *Siparuna brasiliensis* protease inhibitors at 500 mg/kg or 1000 mg/kg via oral gavage. The study assessed clinical scores, central nervous system histopathology, and cytokine levels (IL-12p70, IFN-γ, IL-6, IL-17, and IL-10). Additionally, the identity of the active protein components was confirmed using SDS-PAGE and NMR analysis.

### Results

demonstrated that protein extract treatment significantly reduced clinical disease scores, neuroinflammation, and brain and spinal cord demyelination. Additionally, the inhibitors modulated inflammatory cytokine levels, promoting a beneficial immune response. SDS-PAGE and NMR analysis identified active protein components in the extract with molecular weights of approximately 12 and 15 kDa, consistent with Bowman-Birk-type protease inhibitors.

### Conclusion

These findings highlight the neuroprotective and immunomodulatory effects of *Siparuna brasiliensis* protease inhibitors, suggesting their potential as therapeutic agents for autoimmune diseases.

### Keywords

Protease inhibitors · Neuroinflammation · Immunomodulation · Cytokine regulation

### Article metrics

Metric data currently unavailable

### Supplementary materials (1)

### Related articles (40)

Depletion of CD20 B cells fails to inhibit relapsing mouse experimental autoimmune encephalomyelitis  
Sefia et al.  
*Multiple Sclerosis and Related Disorders*, March 28, 2017

Muscle carnosine in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis  
Keylman et al.  
*Multiple Sclerosis and Related Disorders*, February 11, 2018

Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely  
Boker et al.  
*Multiple Sclerosis and Related Disorders*, May 14, 2014

Show more ▾

## Artigo 6: ainda não publicado

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
<input checked="" type="checkbox"/> Contact Journal ADM: Admin, BJPS	BJPS-2025-0262.R1	PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES BETWEEN XYLOSMA PROCKIA (TURCZ.) TURCZ. FRACTION AND B-CYCLODEXTRIN <a href="#">View Submission</a> ■ Accept (10-Oct-2025)	08-Sep-2025	20-Sep-2025

Artigo 7: <https://doi.org/10.54033/cadpedv22n1-279>

**Avaliação e problematização de índices de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva extravirgem em comparação com óleo de soja**

**Assessment and problematization of identity and quality indexes of extra virgin olive oil samples, in comparison with soybean oil**

**Evaluación y problematización de índices de identidad y calidad de muestras de aceite de oliva virgen extra, en comparación con el aceite de soja**

DOI: 10.54033/cadpedv22n1-279

Originals received: 12/27/2024  
 Acceptance for publication: 01/17/2025

**Rafaela Marcelino Rosa Xavier**

Graduada em Farmácia

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-GV)

Endereço: Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

E-mail: rafaxavier15rx@gmail.com

**Andréa Alves Simiqueli**

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-GV)

Endereço: Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

E-mail: andrea.simiqueli@uff.br

**Michele Correa Bertoldi**

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora Valadares (UFJF-GV)

Endereço: Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

E-mail: michele.bertoldi@uff.br

**Maiara Rodrigues Salvador**

Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-GV)

Endereço: Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

E-mail: maiara.salvador@uff.br

**Ângelo Márcio Leite Denadai**

Doutor em Química

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-GV)

Endereço: Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

E-mail: angelo.denadai@uff.br



## Nutritional aspects of non-conventional edible plants from Brazil: Caruru (*Amaranthus spinosus* L.) and trapoeraba (*Commelina benghalensis*)

Lucélia Vieira Pereira <sup>a,\*</sup>, Maiara Rodrigues Salvador <sup>b</sup>, Beatriz Souza Silva <sup>c</sup>,  
Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana <sup>d</sup>, Ceres Mattos Della Lucia <sup>d</sup>, Reinaldo Duque Brasil  
Landulfo Teixeira <sup>e</sup>, Leandro de Moraes Cardoso <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Applied Health Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brasil

<sup>b</sup> Multicenter Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brasil

<sup>c</sup> Department of Nutrition, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brasil

<sup>d</sup> Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

<sup>e</sup> Basic Department of Life Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Amaranthus spinosus*  
*Commelina benghalensis*  
Non-conventional edible plants  
Nutritional profile

### ABSTRACT

Caruru (*Amaranthus spinosus* L.) and trapoeraba (*Commelina benghalensis*) are NCEPs introduced into Brazil and are widely used by certain communities. Given the lack of information on carotenoids, vitamins, and minerals present in *A. spinosus* and *C. benghalensis* grown in Brazil, this study aimed to determine the proximate composition and the micronutrient profile of these two NCEPs obtained from family farming in the Middle Doce River (Médio Rio Doce) region in the state of Minas Gerais, Brazil. The proximate composition was evaluated using AOAC methods, vitamin E by HPLC with fluorescence detection, vitamin C and carotenoids by HPLC-DAD, and minerals by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma. In summary, the leaves of *A. spinosus* exhibited a high content of dietary fiber (10.20 g·100 g<sup>-1</sup>), potassium (708.8 mg·100 g<sup>-1</sup>), iron (4.0 mg·100 g<sup>-1</sup>) and β-carotene (6.94 mg·100 g<sup>-1</sup>), while the leaves of *C. benghalensis* were sources of potassium (1399.31 mg·100 g<sup>-1</sup>), iron (5.7 mg·100 g<sup>-1</sup>), calcium (163 mg·100 g<sup>-1</sup>), zinc (1.3 mg·100 g<sup>-1</sup>), ascorbic acid (23.61 mg·100 g<sup>-1</sup>), and β-carotene (31.33 mg·100 g<sup>-1</sup>). It was therefore concluded that *C. benghalensis* and *A. spinosus*, especially, presented excellent potential as important nutritional sources for human consumption, highlighting the gap existing between the available technical and scientific material, thus making them an important and necessary axis of research.

### 1. Introduction

Planet Earth has an enormous biodiversity with food potential which is still little explored. Of the approximately 300,000 known edible plant species, only 150 to 200 are used by humans, with 60% of the calories and protein obtained from ingesting plants coming from three main sources – rice, corn, and wheat (FAO, 2004). This limited consumption pattern restricted to only few species of plants, cultivated in specific areas of the planet, greatly diminishes the pillars of food security and the potential nutritional gains for human health, especially considering the autonomy of choice, availability, access, and use of these foods (Alonso, Cockx, & Swinnen, 2018).

One way to circumvent this problem is to popularize the use of non-

conventional edible plants (NCEP), which are plants normally found in urban areas, especially in crevices on asphalt, backyards, sidewalks, and vacant lots. NCEPs may be native, exotic, spontaneous, wild, or cultivated, being traditionally consumed or used therapeutically in some regions or cultures, and have great economic and nutritional potential (Silva et al., 2021).

Brasil has one of the greatest biodiversity in the world, hosting such plants as caruru (*Amaranthus spinosus* L.) and trapoeraba (*Commelina benghalensis*). These NCEP were introduced into the country and are recurrently cited by local family farmers from the Middle Doce River (Médio Rio Doce) region (Brazil) as used and important in human food. *A. spinosus* is a plant originating from the tropical lowland of South and Central America and was introduced into other tropical and subtropical

\* Corresponding authors at: Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Administrative headquarters: Street São Paulo, 745 - downtown, Gov. Valadares, MG CEP 35010-180, Brazil.

E-mail addresses: lucelia.vieira@estudante.ufjf.br (L.V. Pereira), leandro.cardoso@ufjf.br (L.M. Cardoso).



## Ursolic Acid Derivatives Down Regulate Inflammatory Mediators

Elaine C. Scherrer,<sup>a</sup> Ydia M. Valadares,<sup>a</sup> Caio C. S. Alves,<sup>®,b</sup> Alessandra P. Carli,<sup>b</sup> Bárbara G. R. Fernandes,<sup>a</sup> Paloma E. Carvalho,<sup>a</sup> Karla A. Ramos,<sup>b</sup> Maiara R. Salvador,<sup>a</sup> Jeferson G. da Silva,<sup>a</sup> Fernando S. Silva,<sup>a</sup> Ângelo M. L. Denadai<sup>®,a</sup> and Sandra B. R. Castro<sup>®,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
 35010-180 Governador Valadares-MG, Brazil

<sup>b</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
 39803-371 Teófilo Otoni-MG, Brazil

Ursolic acid (UA) is being investigated due to its anti-inflammatory potential, and structural modifications can enhance its biological activities. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of the ursolic acid derivatives (UAD) in macrophages and in the carrageenan-induced paw edema model. RAW264.7 cells were cultured in the presence or absence of UA or UAD (I-18). Nitric oxide (NO), nuclear factor kappa B (NF-κB), tumor necrosis factor (TNF), and cellular viability were measured. 30 min before the carrageenan-induced paw edema, the UAD1 and UAD2 (200 mg kg<sup>-1</sup>) were administered intraperitoneally. The results showed that UAD2-4, UAD7, UAD9-11 had half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) greater than 90 μM and were able to reduce NO, NF-κB and TNF production. Moreover, UAD1 and UAD2 reduced paw edema and IL-6 production. In conclusion, the results obtained demonstrated a variation in the response between the derivatives due to the chemical modifications, showing potential to reduce the inflammatory mediators, deserving further investigations.

**Keywords:** ursolic acid, macrophage, carrageenan, inflammation

### Introduction

The inflammation processes are associated with the development of several diseases, acute or chronic, many of them of unclear origin, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and Crohn's disease.<sup>1,2</sup> The activation of macrophages is related to the production of inflammatory cytokine and transcription factor expression, such as tumor necrosis factor (TNF) and nuclear factor kappa B (NF-κB), respectively, playing a major role in the establishment of the inflammation.

The cytokines are involved in the activation of endothelial cells and leukocyte infiltration.<sup>3</sup> The TNF is a pro-inflammatory cytokine that has several functions, such as inducing the production of other cytokines and lipid mediators of inflammation, proliferation, cell differentiation and apoptosis.<sup>4</sup> Although the macrophage lineage cells are the main source of TNF, in inflammatory

diseases, it can be produced by a wide variety of cells including neutrophils, fibroblasts and endothelial cells.<sup>5</sup>

The transcription factor NF-κB stands out, which plays a crucial role in the initiation and amplification of inflammation. NF-κB consists of a protein assembly located in the cytoplasm of cells and its activity is controlled by a family of inhibitor proteins, denominated IκB, which bind to the NF-κB dimer, promoting its inhibition. This factor regulates the expression of several genes that code inducible nitric oxide synthase (iNOs), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF-α, interleukin-1-beta (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6), which are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases.<sup>6,8</sup>

Nitric oxide (NO) is a powerful inflammatory mediator, produced by macrophages and is involved in the regulation of several physiological processes. NO can be generated in excess during the host's response against damage caused by pathogens or other substances, contributing to the pathogenesis of various inflammatory disorders including tissue damage, septic shock, and rheumatoid arthritis.<sup>9,10</sup> Therefore, lipopolysaccharide (LPS)-induced

\*e-mail: angelomld@gmail.com  
 Editor handled this article: Brenno A. D. Neto



## Research article

## Proximate composition and characterization of the vitamins and minerals of dandelion (*Taraxacum officinale*) from the Middle Doce River region – Minas Gerais, Brazil<sup>☆</sup>

Lionardo Conte de Almeida<sup>a</sup>, Maiara Rodrigues Salvador<sup>b,\*</sup>, Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana<sup>c</sup>, Ceres Mattos Della Lucia<sup>c</sup>, Reinaldo Duque Brasil Landulfo Teixeira<sup>d</sup>, Leandro de Moraes Cardoso<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil

<sup>b</sup> Multicenter Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

<sup>d</sup> Department of Basic Life Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Nutritional profile

Unconventional food plant

Proximate analysis

Physical characteristics

## ABSTRACT

This study aimed to determine the chemical composition and the vitamin, carotenoid, and mineral profile in dandelion (*Taraxacum officinale*) collected from the Middle Doce River region (Médio Rio Doce) in the state of Minas Gerais, Brazil. To accomplish this, the physicochemical parameters, such as titratable acidity, pH, and soluble solids were determined, in addition to the evaluation of the plants' proximate composition (moisture, ash, proteins, dietary fibers, and lipids). The vitamin E, carotenoids and vitamin C were determined by HPLC and the minerals were analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. The *T. officinale* samples presented a low content of macronutrients, a total energy value of 27.88 kcal.100 g<sup>-1</sup> FW, a high fiber content (3.7 g.100 g<sup>-1</sup> FW), low levels of total vitamin E (43.67 µg.100 g<sup>-1</sup> FW), total carotenoids of 11.95 g.100 g<sup>-1</sup> FW, and did not present vitamin C in detectable levels. The mineral analysis revealed a high concentration of iron, manganese, copper, zinc, and selenium, and small amounts or traces of aluminum, cadmium, nickel, and chromium. In conclusion, *T. officinale* was shown to be an important source of nutrients, especially fiber, iron and manganese.

## 1. Introduction

Brazil has a diverse range of flora, with plants frequently studied as to their nutritional potential. Among these, non-conventional edible plants (NCEP) stand out as an important resource to diversify the human diet. Despite the NCEP's economic, social, and environmental value, there is a demand for new studies to elucidate their nutritional and functional potential.

One NCEP found among the Brazilian flora is the dandelion (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg.), which belongs to the Asteraceae family. This plant, originally from Western Europe and Asia, grows spontaneously in the South and Southeast regions of Brazil during the winter and spring (Fatima et al., 2018; Polesi et al., 2017). *Taraxacum officinale* is frequently found in agroforestry yards of family farming areas in the Middle Doce

River region (Médio Rio Doce), in Minas Gerais. Agroforestry yards are used according to agroecological principles, with sustainable management practices which aim to preserve the naturally-occurring diversity of the land by applying appropriate cultivation techniques. In addition, agroforestry yards have been considered an important form of food production, with a unique potential to complement the dietary needs of communities, which contributes to food sovereignty and the conservation of agrobiodiversity found in and around family farming areas (Duque-Brasil et al., 2012; Gonçalves et al., 2021; Lameirada et al., 2020).

*T. officinale* possesses serrated edge pinnipart leaves and yellow flowers. It is often considered a type of "bush" or "weed", due to its easy propagation in pastures, gardens, crops, backyards, and lawns (Blondo et al., 2018). Despite this, in some areas of Brazil, *T. officinale* leaves are eaten fresh in salads or mixed in other preparations, such as *argu*, a

\* This article is a part of the "Unconventional sources of food and food ingredients".

<sup>☆</sup> Corresponding author.

E-mail address: maiara.info@gmail.com (M.R. Salvador).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11949>

Received 20 April 2022; Received in revised form 26 July 2022; Accepted 21 November 2022

2405-6440/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Chapter 4

# Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Jaboticaba Berry: Overview of Composition, Extraction, and Analytical Techniques



Maiara Rodrigues Salvador, Jéssica Anarellis Barbosa dos Santos,  
Juliana Kelly da Silva Maia, Leandro de Morais Cardoso,  
and Ângela Giovana Batista

## Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ASE	Accelerated solvent extraction
C3G	Cyanidin 3-glucoside
DAD	Diode array detection
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay
d-SPE	Dispersive solid-phase extraction
d.w.	Dry weight
ECD	Electrochemical detector
ESI	Electrospray ionization
FRAP	Ferric reducing antioxidant power assay
GAE	Gallic acid equivalents
GC	Gas chromatography
HPLC	High-performance liquid chromatography
MAE	Microwave-assisted extraction
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity assay

M. R. Salvador · L. de Morais Cardoso · Â. G. Batista (✉)  
Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares,  
MG, Brazil  
e-mail: angela.batista@ufjf.br

J. A. B. dos Santos · J. K. da Silva Maia  
Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil