

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – CAMPUS GOVERNADOR
VALADARES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

PALOMA ESTEVES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DO RÓDIO (III) E DOS
COMPLEXOS DE RÓDIO (III) COM CICLODEXTRINAS**

GOVERNADOR VALADARES

2020

Paloma Esteves de Carvalho

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DO RÓDIO (III) E DOS
COMPLEXOS DE RÓDIO (III) COM CICLODEXTRINAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de fora *campus* Governador Valadares.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

GOVERNADOR VALADARES

2020

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

Carvalho, Paloma Esteves de.

Avaliação do potencial imunomodulador do ródio (III) e dos complexos de ródio (III) com ciclodextrinas. / Paloma Esteves de Carvalho. -- 2020.

104 f. : il.

Orientadora: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Dissertação (mestrado acadêmico) - 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, 2020.

1. Ródio. 2. Ciclodextrinas. 3. Complexos de coordenação. 4. Inflamação. I. Castro, Sandra Bertelli Ribeiro de, orient. II. Título.

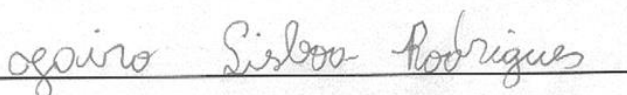
Paloma Esteves de Carvalho

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DO RÓDIO
(III) E DOS COMPLEXOS DE RÓDIO (III) COM CICLODEXTRINAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Biologia Molecular pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares.

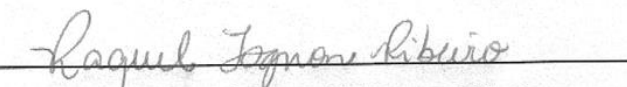
Aprovada em 06/03/2020.

BANCA EXAMINADORA




Dr. Jairo Lisboa Rodrigues

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) – *Campus* Mucuri



Profa. Dra. Raquel Tognon Ribeiro

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *Campus* Governador Valadares



Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *Campus* Governador Valadares

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais Celso de Fátima Esteves e Marisete Esteves, à
minhas irmãs Luana Carvalho e Camila Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder e permitir cumprir mais uma etapa da minha vida, por ter me dado força e saúde e por colocar tantas pessoas boas no meu caminho. A Maria, que sempre têm passado a frente e iluminado minhas escolhas.

À minha orientadora, Prof. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, por ter tornado possível a realização deste trabalho. Pela competência, pela paciência, pela dedicação e pela responsabilidade a qual realiza o seu trabalho. Obrigada também, pela contribuição com meu crescimento profissional e pessoal. Não tenho palavras para agradecê-la.

Aos colaboradores, sem eles não seria possível a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai pela imensa contribuição na síntese e caracterização físico-química dos complexos. Agradeço também, por todos os ensinamentos, incentivos e dedicação ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Caio César de Souza Alves, pelos ensinamentos, pela disponibilidade prestada, por não medir esforços em se deslocar para Governador Valadares e contribuir na materialização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva, pela disposição em sempre ajudar a todos, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos e amizade. Obrigada por assumir o papel de Pai de tantos alunos da UFJF-GV.

Aos grandes amores da minha vida, minha FAMÍLIA. Por serem tão importantes para mim. A ela dedico este trabalho. A meu pai, Celso de Fátima Esteves Ramos, pelo cuidado, pelo amor, pela sensibilidade e pelo dom paterno. A minha mãe, Marisete Esteves de Carvalho, por ser o meu maior exemplo de força, honestidade e determinação, por cultivar suas filhas com mesmo amor ao qual cultiva suas orquídeas. As minhas irmãs, Luana Esteves de Carvalho, pelo coração tão nobre, pela preocupação, companheirismo e amor e; Camila Esteves de Carvalho, por muitas vezes transpor o papel de irmã ao se tornar uma mãe, pelos conselhos, amor e cuidado. Obrigada também, por acreditarem tanto no meu potencial. Eu amo muito vocês.

A todos os alunos de iniciação científica que fizeram parte da nossa equipe nestes dois anos de trabalho. Em especial a Cleonice e Barbara, pela ajuda, pela companhia durante os experimentos e pela amizade construída.

Aos companheiros de laboratório, Bolívar, Elaine, Alan e Maiara, muito obrigada por todas as contribuições, pelo companheirismo e pelas palavras de conforto. Vocês contribuíram para que os meus dias fossem mais leves. Meu muito obrigada.

A todos os meus amigos pelas palavras nas horas difíceis, pelas companhias, pela compreensão das ausências e dos momentos de estresse.

A Universidade Federal de Juiz de Fora- *campus* Governador Valadares, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e a todos os professores envolvidos, obrigada por permitirem que sonhos sejam realizados.

A FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro concedido e pela bolsa.

As universidades parceiras, a UFMG pela contribuição no desenvolvimento do experimento de RMN, e a UFVJM *campus* Mucuri pela parceria na experimentação animal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional. Muito obrigada!

Posso todas as coisas naquele que me fortalece. (Filipenses 4:13)

RESUMO

A inflamação é uma resposta coordenada do organismo contra infecções e lesões teciduais, com objetivo de preservar o organismo e eliminar o agente agressor. Contudo, uma resposta inflamatória em longo prazo tem um efeito prejudicial e desempenha um papel crítico no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crônicas, além de o tratamento disponível apresentar diversos efeitos indesejáveis. Em resposta a esses problemas, inúmeras estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, dentre elas o uso de metais de transição. O ródio (Rh) é um metal de transição e recentemente sua atividade imunomoduladora e potencial atividade anti-inflamatória vem sendo explorada, apresentando-se como agente promissor para o tratamento de doenças inflamatórias. Na tentativa de desenvolver novos medicamentos, a coordenação de substâncias com ciclodextrinas (CDs) tem se destacado devido a melhora na estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunomodulador do Rh (III) puro e após coordenação em CDs. A caracterização estrutural dos complexos foi realizada por espectroscopia de infravermelho, análise térmica e RMN de ^1H ; a determinação da estequiometria e dos parâmetros termodinâmicos de interação (K_{eq} , $\Delta_{\text{int}}\text{H}^\circ$, $\Delta_{\text{int}}\text{G}^\circ$ e $T\Delta_{\text{int}}\text{S}^\circ$) foram realizadas por titulação calorimétrica isotérmica; e a caracterização coloidal dos agregados espontaneamente formados foi realizada por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta. Para os ensaios biológicos, foi realizada *in vitro* a análise da citotoxicidade celular pelo método de MTT, a avaliação da produção de óxido nítrico pelo método de Griess, e a expressão de NF- κ B por citometria de fluxo em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1. Foi também realizado o ensaio *in vivo* de edema em patas de camundongos induzido por carragenina. Através da análise físico-química foi possível verificar a formação dos complexos de coordenação do Rh (III) em ambas as CDs, sendo um processo endotérmico para o sistema com β CD, e exotérmico para o sistema com HP β CD, com aumento do tamanho dos agregados de ciclodextrinas. Com relação aos testes biológicos *in vitro*, o Rh (III) e os complexos reduziram a produção de NO, sem alteração significativa da viabilidade celular, e ainda reduziram a expressão do NF- κ B com perfis diferentes nas linhagens estudadas. No ensaio *in vivo*, reduziram a espessura da pata dos camundongos. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a atividade imunomoduladora e um potencial anti-inflamatório do Rh (III) e de seus complexos de coordenação Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD. Maiores estudos são necessários para confirmar o uso do Rh (III) e dos seus complexos como futuros candidatos para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Ródio. Ciclodextrinas. Complexos de coordenação. Inflamação.

ABSTRACT

Inflammation is a coordinated response by the body against infections and tissue damage, with the aim of preserving the body and eliminating the offending agent. However, a long-term inflammatory response has a detrimental effect and plays a critical role in the development of several chronic inflammatory diseases, in addition to the available treatment having several undesirable effects. In response to these problems, numerous therapeutic strategies have been studied, including the use of transition metals. Rhodium (Rh) is a transition metal and recently its immunomodulatory and potential anti-inflammatory activity has been explored, presenting itself as a promising agent for the treatment of inflammatory diseases. In an attempt to develop new drugs, the coordination of substances with cyclodextrins (CDs) has stood out due to the improvement in stability, solubility and bioavailability. Therefore, the objective of this work was to evaluate the immunomodulatory potential of pure Rh (III) and after coordination in CDs. The structural characterization of the complexes was carried out by infrared spectroscopy, thermal analysis and ^1H NMR; the determination of stoichiometry and the thermodynamic parameters of interaction (K_{eq} , $\Delta_{\text{int}}H$, $\Delta_{\text{int}}G^\circ$ and $T\Delta_{\text{int}}S^\circ$) were performed by isothermal calorimetric titration; and the colloidal characterization of spontaneously formed aggregates was performed by dynamic light scattering and zeta potential. For biological assays, cell cytotoxicity was analyzed *in vitro* by the MTT method, the evaluation of nitric oxide production by the Griess method, and the expression of NF- κ B by flow cytometry, in RAW 264.7 and J774A.1 macrophages. The *in vivo* model of mouse paw edema induced by carrageenan was also performed. Through the physicochemical analysis, it was possible to verify the formation of coordination complexes of Rh (III) in both CDs, being endothermic for the system with β CD, and exothermic for the system with HP β CD, with an increase in the size of the cyclodextrin aggregates. Regarding *in vitro* biological tests, Rh (III) and complexes reduced NO production, without causing toxicity to cells, and also reduced the expression of NF- κ B with different profiles in the studied strains. In addition, they reduced the thickness of the mice's paw. The results obtained in the present study demonstrate the immunomodulatory activity and anti-inflammatory potential of Rh (III) and its coordination complexes Rh(III)/ β CD and Rh(III)/HP β CD. Further studies are needed to confirm the use of Rh (III) and its complexes as future candidates for the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: Rhodium. Cyclodextrin. Coordination complex. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	— Via de sinalização para a ativação do NF- κ B e expressão de genes.	27
Figura 2	— Estrutura química das ciclodextrinas (α , β e γ CD) naturais.	31
Figura 3	— Representação estrutural de uma unidade glicosídica em conformação de cadeira.	32
Figura 4	— Representação esquemática da estrutura funcional das ciclodextrinas.	33
Figura 5	— Estrutura química da HP β CD.	34
Figura 6	— Representação esquemática da formação do complexo do tipo sanduíche homo metálico.	36
Figura 7	— Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa	42
Figura 8	— Espectros de infravermelho do Rh (III), β CD, MM e Rh(III)/ β CD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.	50
Figura 9	— Espectros de infravermelho do Rh (III), HP β CD, MM e Rh(III)/HP β CD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.	51
Figura 10	— Curvas de TGA (A), DTG (B) e DTA (C) da β CD, RhCl_3 , Rh(III)/ β CD e MM.	54
Figura 11	— Curvas de TGA (A), DTG (B) e DTA (C) da HP β CD, RhCl_3 , Rh(III)/HP β CD e MM.	56
Figura 12	— Espectros de RMN de ^1H da β CD e Rh(III)/ β CD em D_2O , 400 MHz.	59
Figura 13	— Espectros de RMN de ^1H da HP β CD e Rh(III)/HP β CD em D_2O , 400 MHz.	60
Figura 14	— Titulação calorimétrica isotérmica do RhCl_3 (60 mM em água) em solução de β CD (4 mM em água) a 25°C.	62
Figura 15	— Titulação calorimétrica isotérmica do RhCl_3 (60 mM em água) em solução de β CD (4 mM em água) a 25°C.	63
Figura 16	— Distribuição do tamanho de agregados de partículas formados em solução aquosa, em função da $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$	65
Figura 17	— Distribuição do tamanho de agregados de partículas formados em solução aquosa, em função da $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$	66

Figura 18	— Titulação condutimétrica de Rh (III) 60 mM em β CD 4mM	67
Figura 19	— Titulação condutimétrica de Rh (III) 60 mM em HP β CD 4mM	68
Figura 20	— Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção da [Rh(III)/ β CD]	69
Figura 21	— Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção da [Rh(III)/HP β CD]	70
Figura 22	— Curvas de morte de macrófagos RAW 264.7 em função de diferentes concentrações do Rh(III) puro, Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD, após 48 horas de cultura.	75
Figura 23	— Curvas de morte de macrófagos J774A.1 em função de diferentes concentrações do Rh(III) puro, Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD, após 48 horas de cultura.	75
Figura 24	— Avaliação da inibição da produção de NO do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD, e Rh(III)HP β CD em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e TFN- γ , após 48 horas de tratamento.	79
Figura 25	— Avaliação da inibição da produção de NO do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD, e Rh(III)HP β CD em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e TFN- γ , após 48 horas de tratamento.	80
Figura 26	— Expressão por mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh(III), Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).	82
Figura 27	— Porcentagem (%) de expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh(III), Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).	83
Figura 28	— Expressão por mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh(III), Rh(III)/ β CD (A), e Rh(III)/HP β CD (B).	84

- Figura 29** — Porcentagem (%) da expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh(III), Rh(III)/ β CD (A), e Rh(III)/HP β CD (B). 85
- Figura 30** — Variação da espessura (mm) do edema induzido pela carragenina em patas de camundongos Balb/c fêmea após 3 horas de tratamento intraperitonealmente com o Rh (III) (5 mg/Kg), β CD (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) e com PBS (100 μ L). 87
- Figura 31** — Variação da espessura (mm) do edema induzido pela carragenina em patas de camundongos Balb/c fêmea após 3 horas de tratamento intraperitonealmente com o Rh (III) (5 mg/Kg), HP β CD (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/HP β CD (5 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) e com PBS (100 μ L). 88

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** — Características das principais ciclodextrinas naturais. 32
- Quadro 2** — Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos 48
tratamentos.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** — Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho do Rh (III), β CD, MM e Rh(III)/ β CD. 51
- Tabela 2** — Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho do Rh (III), HP β CD, MM e Rh(III)/HP β CD. 52
- Tabela 3** — Deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio (^1H) da β CD e Rh(III)/ β CD (D_2O , 400 MHz). 59
- Tabela 4** — Deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênio (^1H) da HP β CD e Rh(III)/HP β CD (D_2O , 400 MHz). 61
- Tabela 5** — Parâmetros termodinâmicos de interação entre o RhCl_3 e β CD, a 25 °C. 62
- Tabela 6** — Parâmetros termodinâmicos de interação entre o RhCl_3 e HP β CD, a 25 °C. 64
- Tabela 7** — Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh (III), β CD e HP β CD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos RAW 264.7 em 3 horas de cultura. 71
- Tabela 8** — Avaliação da citotoxicidade do complexo Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh (III), β CD e com HP β CD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos J774A.1 em 3 horas de cultura. 72
- Tabela 9** — Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh (III), β CD e HP β CD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos RAW 264.7 em 48 horas de cultura. 73
- Tabela 10** — Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh (III), β CD e com HP β CD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos J774A.1 em 48 horas de cultura. 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
Caco-2	Células de linhagem de adenocarcinoma colorretal
COX	Enzima cicloxigenase
COX-2	Enzima cicloxigenase 2
CI	Complexo de inclusão
CC	Complexo de coordenação
CD	Ciclodextrina
βCD	Beta ciclodextrina
CO	Monóxido de carbono
cm ⁻¹	Número de onda
D ₂ O	Óxido de deutério (água deuterada)
DAI	Índice de atividade da doença
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
DSL	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Análise térmica diferencial
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
HPβCD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina
IC ₅₀	Concentração que inibe o crescimento celular em 50 %

IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina-6
I κ B	Inibidor do fator nuclear kappa B
IKK	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B
IKK α	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B alfa
IKK β	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B beta
IKK γ	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B gama
iNOS	Enzima da família óxido nítrico sintase
ITC	Titulação calorimétrica isotérmica
IV	Infravermelho
J774A.1	Linhagem celular de macrófagos murinos
K	Constante de associação
KBr	Brometo de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CD	Complexo formado pela ligação do metal a ciclodextrina
MHz	Megahertz
MM	Mistura mecânica
MTT	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio
N	Estequiometria de complexação
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NK	Células matadoras naturais (<i>Natural Killer</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico

PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
Ppm	Partes por milhão
PZ	Potencial Zeta
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murinos
Rh	Ródio
Rh(III)/ β CD	Complexo de coordenação do ródio (III) com β CD
Rh(III)/ HP β CD	Complexo de coordenação do ródio com (III) HP β CD
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RRP	Receptor de reconhecimento de padrão
TG	Termogravimetria
TGA	Análise termogravimétrica
T _{max}	Temperatura máxima
TLR	Receptor Toll-like
TLR4	Receptor Toll-like quatro
TNF- α	Fator necrose tumoral – alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
T Δ S	Entropia
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	23
2.1	FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO	23
2.2	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	25
2.3	PROPRIEDADES QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO RÓDIO	28
2.4	SISTEMAS SUPRAMOLECULARES	31
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES UTILIZADOS	40
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
4.3	PREPARO DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO E MISTURAS MECÂNICAS	40
4.4	CHARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO	43
4.4.1	<i>Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	43
4.4.2	<i>Análise Térmica: Termogravimetria (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)</i>	43
4.4.3	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN de ¹H)</i>	43
4.4.4	<i>Titulações Calorimétricas Isotérmicas (ITC)</i>	44
4.4.5	<i>Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ)</i>	44
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	45
4.5.1	<i>Etapa in vitro</i>	45
4.5.1.1	Cultura de RAW 264.7 e J774A.1	45
4.5.1.2	Avaliação da citotoxicidade dos complexos de coordenação em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1	45
4.5.1.3	Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com os complexos de coordenação	46

4.5.1.4	Avaliação da expressão de NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com os complexos de coordenação	46
4.5.2	<i>Etapa in vivo</i>	47
4.5.2.1	Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD no modelo <i>in vivo</i> da indução de edema de pata de camundongos pela carragenina	47
4.5.2.2	Animais	47
4.5.2.3	Preparação e utilização dos compostos para teste <i>in vivo</i>	47
4.5.2.4	Indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com o Rh (III) e com os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD	47
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO	49
5.1.1	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	49
5.1.2	<i>Análise Termogravimétrica e Termogravimetria derivada (TGA/DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)</i>	53
5.1.3	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)</i>	58
5.1.4	<i>Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)</i>	61
5.1.5	<i>Espalhamento de luz dinâmico</i>	64
5.1.6	<i>Condutimetria</i>	67
5.1.7	<i>Potencial Zeta</i>	68
5.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	71
5.2.1	<i>Avaliação da citotoxicidade dos complexos de coordenação em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1</i>	71
5.2.2	<i>Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com os complexos de coordenação</i>	78
5.2.3	<i>Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de coordenação na expressão de NF-κB por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 estimulados com LPS e IFN-γ</i>	82

5.2.4	<i>Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de Rh(III)/βCD e Rh(III)/HPβCD no modelo in vivo da indução de edema de pata de camundongos pela carragenina</i>	86
6	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO A - Comitê de Ética em Experimentação Animal	104

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa desencadeado por células específicas do organismo em resposta às infecções ou danos celulares, que tem por objetivo erradicar os agentes invasores e remover substâncias danosas (PARK et al., 2006; ZHOU et al., 2007). A resposta inflamatória inicial é geralmente aguda sendo caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, promovendo o infiltrado de células e formação do edema, resultado do extravasamento de fluidos e proteínas (POSADAS et al., 2004).

Os macrófagos são importantes células da resposta imunológica inata e desempenham papel crucial em processos inflamatórios, seja na defesa do organismo durante a invasão por patógenos, ou em desordens como, por exemplo, doenças autoimunes (LEAL et al., 2013). Os macrófagos por meio de receptores de padrões moleculares, tais como *Toll-like* (TLR) e *Nod-like* reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) (CALIXTO et al., 2004). Os macrófagos possuem diversos tipos de TLR, muitos deles estão presentes e associados à membrana plasmática, enquanto outros são intracelulares localizados em compartimentos endossomais. Estes receptores interagem com padrões moleculares diversos e desencadeiam sinalizações intracelulares que irão propiciar a ativação de fatores de transcrição importantes para a produção de mediadores pró-inflamatórios (MEDZHITOV, 2010; MODLIN, 2012).

Para uma resposta inflamatória apropriada e eficaz, é necessária uma regulação cuidadosa de mediadores pró-inflamatórios, já que uma resposta excessiva pode causar lesão no tecido hospedeiro e doenças inflamatórias crônicas (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; MANTOVANI et al., 2008). A importância da inflamação para a homeostase é evidenciada pelo fato de alterações na resposta inflamatória comprometerem a saúde do indivíduo tornando-o susceptível a diversas doenças, recomendando-se, neste caso, o uso de anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (PARK et al., 2006). Contudo, a utilização desses fármacos também está associada ao surgimento de efeitos adversos, que incluem transtornos gastrointestinais e alterações cardiovasculares (SANTOS, 2017; SARINHO; MELO, 2017). Além disso, muitas doenças inflamatórias crônicas não apresentam tratamentos eficazes (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016). Tais fatores incentivam a busca por novos agentes que possam ser eficientes, trazendo mais benefícios, menos danos e mais acessibilidade à população (ANNANE, 2008; CELLOTTI; LAUFER, 2001).

Dentro deste contexto, o desenvolvimento de agentes farmacológicos que interfiram na produção de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, de citocinas pró-inflamatórias e na

expressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B) são cruciais para o controle de processos inflamatórios caracterizados por uma produção excessiva e/ou prolongada desses mediadores (MA et al., 2016; ZHONG et al., 2012).

Os complexos de metais de transição, especialmente com elementos do Grupo 9 da tabela periódica, tem despertado interesse em aplicações medicinais no desenvolvimento de novas pesquisas devido seu potencial redox o que favorece sua capacidade de ligação a biomacromoléculas com alta especificidade (MA et al., 2016; ZHONG et al., 2012).

Nesse contexto, compostos à base de ródio têm-se demonstrado promissores na imunomodulação. Em 2012, Zhong e colaboradores mostraram o potencial anti-inflamatório do complexo ciclometalado de ródio (III) (Rh (III)) que mostrou atividade inibidora da enzima de ativação de NEDD8 (NAE). A inibição específica da NAE poderia modular a degradação de substratos, como o inibidor do fator de transcrição I κ B α (I κ B α) que desempenha papel significativo na sinalização do NF- κ B, progressão do ciclo celular e inflamação (DEBRECZENI et al., 2006; PODUST et al., 2000; ZHONG et al., 2012). Além disso, mais recentemente outros estudos mostraram a potencial atividade imunomoduladora (MORAGUES et al., 2013) e anti-inflamatória (ZHONG et al., 2016) de diferentes complexos de Rh (III) que foram capazes de inibir a produção de mediadores inflamatórios.

Até o presente momento, foram identificados poucos trabalhos avaliando a atividade imunomoduladora e potencial atividade anti-inflamatória do Rh (III). Além disso, é de grande relevância explorar o desenvolvimento de novos complexos com este elemento químico, modificando ou potencializando a atividade biológica deste metal de transição (MA et al., 2016; ZHONG et al., 2012). Uma classe de compostos promissores para esta finalidade são as ciclodextrinas, que são capazes de formar complexos supramoleculares de inclusão com moléculas orgânicas (PIN et al., 2019; SILVA et al., 2019; VUKIC et al., 2019) além de complexos de coordenação com metais de transição (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por unidades de D-glicopiranosose. As CD's naturais mais comuns e as únicas utilizadas em produtos farmacêuticos são a α , β e γ que possuem 6, 7 e 8 unidades glicosídicas, respectivamente. A beta ciclodextrina (β CD) tem sido mais utilizada pela indústria farmacêutica, uma vez que permite formar complexos de inclusão com diversas moléculas, cuja massa molar pode variar entre 100 e 400 g.mol⁻¹ além de, apresentar baixo custo, elevada disponibilidade e seu uso ter sido aprovado como excipiente para formulações de uso oral (KURKOV; LOFTSSON, 2013; UEKAMA; IRIE, 2004). Entretanto, a β CD apresenta baixa solubilidade aquosa. Uma solução para este

problema foi encontrada através da substituição dos grupos hidroxílicos da molécula por diversos grupos funcionais, e assim melhorar a solubilidade, a toxicidade e aumentar a capacidade de inclusão de seus derivados. Portanto, a hidroxipropil-betaciclodextrina (HP β CD), origina-se pela substituição dos grupos hidroxílicos por substituintes hidroxipropilas (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Embora existam estudos avaliando o potencial imunomodulador e anti-inflamatório de complexos de ródio, este é o primeiro estudo que mostra a avaliação do Rh (III) puro e do Rh (III) complexado com β CD e HP β CD na modulação da resposta imune *in vitro*, em macrófagos murinos, e *in vivo*, no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta natural que possui papel importante na defesa do organismo, sendo a primeira linha de proteção a estímulos nocivos como células danificadas, invasão por patógenos, ação de agentes químicos e físicos, visando a restauração da homeostasia e integridade do tecido (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; MEDZHITOV, 2008). A inflamação apresenta sinais macroscópicos clássicos que podem ser definidos como rubor, calor, edema, dor e perda de função (LAWRENCE; FONG, 2010).

Esses sinais são decorrentes de alterações nos vasos sanguíneos promovendo vasodilatação cujo objetivo é causar aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo levando a consequente extravasamento de fluido rico em proteínas para o tecido, que contribuem para a formação do edema (POSADAS et al., 2004). A migração celular, outro fenômeno marcante, ocorre como resultado da produção local de vários mediadores inflamatórios, que apresentam atividade quimiotática e de alterações das proteínas de membrana do endotélio vascular, facilitando o rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão às células endoteliais e, finalmente, a transmigração e acúmulo no local de injúria (DA SILVA et al., 2003).

As fases da inflamação podem ser caracterizadas em aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda apresenta eventos de curta duração, que se desenvolvem em horas ou dias com predomínio de neutrófilos, enquanto que a resposta crônica se desenvolve em longa duração, com predomínio de linfócitos, macrófagos e plasmócitos (CIEMNIECK et al., 2016).

A inflamação aguda é um mecanismo de defesa imediato e pode ser desencadeada pela exposição do tecido a PAMPs e DAMPs, que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) presentes na superfície das células pró-inflamatórias, como macrófagos, resultando na ativação, produção e liberação de diversos mediadores moleculares que iniciarão o processo inflamatório. Essas substâncias alteram o fluxo sanguíneo, induzem a vasodilatação e promovem aumento da permeabilidade vascular, estabelecendo a infiltração celular e consequente formação de edema e acúmulo de leucócitos no local da lesão (SCHIMMEL; HEEMSKERK; BUUL, 2016; YADAV et al., 2010).

Dentre os RRP, os TLR se destacam pelo seu papel central na ligação de patógenos e iniciação da resposta inflamatória, esses receptores são destinados para diferentes PAMPs, tais como, lipopolissacarídeos (LPS) uma endotoxina presente na parede celular das bactérias gram-

negativas que são reconhecidas pelo TLR4, um receptor *Toll like* (YADAV et al., 2010). A ativação dos RRs por PAMPs induz a fagocitose, liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios com o objetivo de conter a infecção (HALMAN; RAMET; EZEKOWITZ, 2001; YADAV et al., 2010).

Os macrófagos também expressam receptores para interferon-gama (IFN- γ), uma citocina produzida pela ativação de linfócitos T CD4 e CD8 e célula natural killer (NK), sendo assim reconhecido como mediador da resposta imunológica. Entre as atividades biológicas do IFN- γ , a ativação de macrófagos é uma das principais funções, tornando-os mais eficientes na destruição de microrganismos fagocitados. Além disso, o IFN- γ induz a produção de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, citocinas e óxido nítrico (NO) (MUHL; PFEILSCHIFTER, 2003).

Durante o processo inflamatório células efetoras do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e NK, que possuem RRs e reconhecem PAMPs e DAMPs, são recrutadas para o local da lesão para iniciar a resposta inflamatória (TANG et al., 2013). Estas células tendem a se acumular no sítio de infecção, sendo a primeira linha de defesa frente ao patógeno. A migração processa-se em etapas: migração em direção ao estímulo quimiotático; posterior rolamento e adesão; promovendo a saída das células do vaso sanguíneo por diapedese e fagocitose e desgranulação a partir da ativação leucocitária (DA SILVA et al., 2003).

A indução de edema em patas de camundongos pela carragenina é um modelo experimental amplamente utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de novas substâncias, onde a inflamação local ou sistêmica é associada com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (POSADAS et al., 2004). A carragenina é um polissacarídeo proveniente de algas marinhas vermelhas, pertencentes à família das *Rhodophyceae*. É amplamente utilizado como agente indutor de inflamação aguda, devido a sua rápida ação e ativação de mediadores pró-inflamatórios (FERREIRA et al., 2004).

O edema de pata de camundongo induzido pela carragenina é um modelo inflamatório agudo que consiste em duas fases: a primeira, detectada em torno de uma hora, conhecida como fase rápida, com liberação de histamina, serotonina e bradicina; a segunda fase é chamada tardia, com os mediadores inflamatórios liberados após duas ou três horas como, cininas e prostaglandinas, respectivamente (CARVALHO, 2011; DI ROSA; GEROUDE; WILLOUGHBY, 1971).

A inflamação aguda pode culminar em resolução completa, com a cicatrização e reconstituição tecidual ou ainda evoluir para uma inflamação crônica (GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). A transição da

inflamação aguda para crônica pode ocorrer devido à persistência do agente lesivo, interferência no reparo tecidual ou desregulação de quaisquer etapas da resposta inflamatória. Algumas situações, além de uma resposta aguda defeituosa, favorecem o estabelecimento da inflamação crônica, como no caso das doenças autoimunes, por exemplo, a artrite reumatoide, o lúpus, a doença de Crohn, e as desordens degenerativas como a doença de Alzheimer (CHAPLIN, 2010; ROBBINS et al., 2001; STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

2.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Diversas substâncias estão envolvidas na modulação da resposta imune durante processos patológicos (MA et al., 2014). A resposta estabelecida durante o desenvolvimento de um processo patológico envolve mediadores, tais como histamina, eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas e quimiocinas que irão atuar na modulação do sistema imunológico e determinar o padrão e a severidade da resposta inflamatória (MA et al., 2014; YADAV et al., 2010).

Eicosanoides são uma classe de moléculas derivadas de ácidos graxos poli-insaturados (NORMAN; HERNRY, 2015). O ácido araquidônico é o principal precursor na biossíntese de eicosanoides, o qual é derivado de fosfolipídios da bicamada lipídica da membrana celular por meio da ação das fosfolipases (GEORGE et al., 2014). As cicloxigenases (COX) convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas H₂, que por sua vez, é transformada em uma série de produtos finais, como prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (PELLETIER et al., 2003). Já as lipoxigenases catalisam a formação de leucotrienos e outros compostos biologicamente ativos através do ácido araquidônico (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

As prostaglandinas são mediadores lipídicos que estão envolvidos em processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, aumento do fluxo sanguíneo renal, diminuição da secreção ácida gástrica (NORMAN; HERNRY, 2015), agregação plaquetária, modulação da função imune, dentre outras (HARRIS et al., 2002).

Dentre os mediadores inflamatórios e vias celulares, que têm sido estudados em associação com processos fisiopatológicos, destaca-se o fator de transcrição NF- κ B que desempenha um papel crucial na iniciação e amplificação da inflamação. O NF- κ B é constituído por um conjunto proteico localizado no citoplasma das células e sua atividade é controlada por uma família de proteínas inibidoras, denominadas I κ B, que se ligam ao dímero NF- κ B, promovendo sua inibição. Este fator regula a expressão de diversos genes que codificam as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOs) e ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1- beta (IL-1 β) e interleucina- 6 (IL-6), que estão envolvidas na patogênese de doenças inflamatórias (BHARTI; AGGARWAL, 2002; DORRINGTON; FRASER, 2019; SORRIENTO et al., 2012). Neste contexto, a produção desordenada e excessiva de mediadores pró-inflamatórios pode estar relacionada com a patogênese de várias doenças e, portanto, esses mediadores são possíveis alvos de substâncias terapêuticas (ELSAYED et al., 2014).

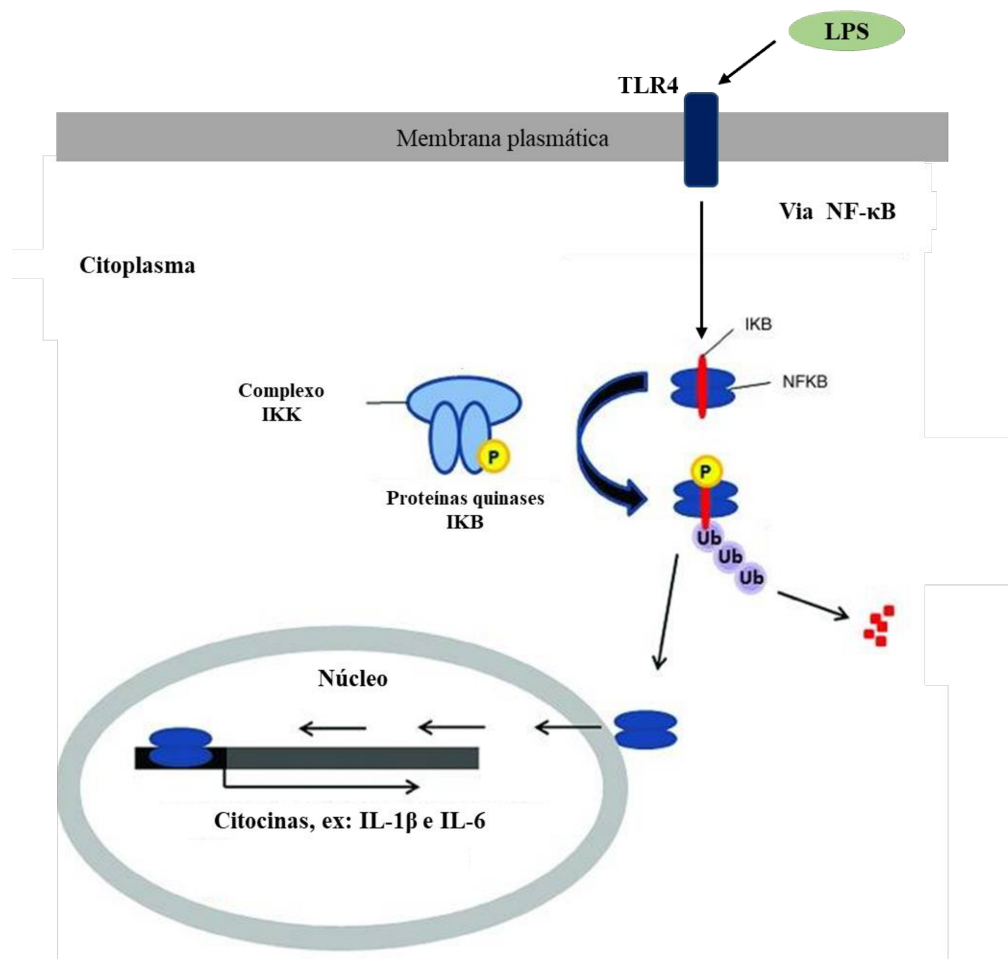
As vias de sinalização para a ativação do NF- κ B são denominadas via clássica também conhecida como via canônica, que promove a ativação do complexo contendo a subunidade do NF- κ B denominada RelA (p65), e a via não canônica (via alternativa), que resultam na ativação de complexos contendo subunidade (Rel-B) do fator nuclear NF- κ B (Rel-B) (LAWRENCE, 2009).

O NF- κ B pode se apresentar na forma de heterodímeros ou homodímeros, sendo o mais comum o p65/p50, provenientes da via clássica. Conforme ilustrado na Figura 1, quando o heterodímero p65/p50 encontra-se associado à proteína I κ B α o heterodímero p65/p50 permanece inativo no citoplasma. A degradação de I κ B α é mediada por proteínas quinases de I κ B (IKK) formada pelas subunidades catalíticas proteína quinase alfa de I κ B (IKK α) e proteína quinase beta de I κ B (IKK β) e a subunidade proteína regulatória (IKK γ), também conhecida como modulador essencial de NF- κ B (NEMO). As proteínas da família de I κ B α são fosforiladas, liberando a forma dimérica ativa de NF- κ B. O NF- κ B (p65/p50) transloca para o núcleo e liga em regiões específicas do DNA regulando a transcrição de genes-alvos (GARG; AGGARWAL, 2002; HAYDEN; GHOSH, 2008).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, secretadas por diferentes tipos de células incluindo macrófagos e medeiam as interações e comunicações celulares (ZHANG; AN, 2007). As citocinas incluem as interleucinas, interferons e TNF. Estas desempenham diversas funções no organismo, como mediação e regulação da imunidade, inflamação e estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular (TAYAL; KALRA, 2008).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que possui várias funções, tais como a indução da produção de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose (TRACEY et al., 2008). TNF pode ser encontrado ligado à membrana celular ou na sua forma solúvel, ambas as formas são biologicamente ativas. Embora as células da linhagem dos monócitos/macrófagos sejam a principal fonte de TNF, em doenças inflamatórias ela pode ser produzida por uma ampla variedade celular incluindo neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais (BRADLEY, 2008).

Figura 1—Via de sinalização para a ativação do NF- κ B e expressão de genes alvo.



Fonte: Adaptado de KARLSEN et al., 2016.

A ativação dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) pode resultar na ativação de NF- κ B que, além de estimular a produção de vários mediadores inflamatórios, pode induzir formação de ROS. Com isso, a inibição deste mediador é objetivo de vários estudos que utilizam novos compostos com potencial ação moduladora da resposta inflamatória (NIU; GUO; ZHOU, 2009).

O NO é um poderoso mediador inflamatório, produzido a partir da L-arginina pela ação da iNOs e está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão e eventos do sistema imunológico. O NO pode ser gerado em excesso durante a resposta do hospedeiro contra danos causados por patógenos ou outras substâncias, tais como compostos químicos, contribuindo na patogênese de vários distúrbios inflamatórios incluindo dano tecidual, choque séptico, e artrite reumatoide (ZHANG et al., 2017; ZHOU et al., 2007). Portanto, a produção de NO induzido por LPS pode refletir o grau de inflamação. A inibição da

produção de NO por células de defesa pode demonstrar a capacidade destas substâncias em atuar como possíveis agentes anti-inflamatórios embora outros mediadores precisem ser avaliados (CHOI et al., 2008; ZHOU et al., 2007).

A utilização de substâncias que controlam a resposta inflamatória tais como anti-inflamatórios esteroidais, está associada ao surgimento de efeitos adversos, que incluem transtornos gastrointestinais, alterações cardiovasculares, entre outros (SANTOS, 2017; SARINHO; MELO, 2017), o que incentiva a busca por novos agentes que possam ser eficientes, trazendo mais benefícios, menos danos e mais acessibilidade a população (ANNANE, 2008; CELLOTTI; LAUFER, 2001).

Portanto, o desenvolvimento de agentes farmacológicos que interfiram na produção de mediadores inflamatórios, tais como NO, prostaglandinas, NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias, são cruciais para o controle de processos inflamatórios que são mediados pela produção excessiva e/ou prolongada desses intermediários por macrófagos e outras células envolvidas na resposta inflamatória.

2.3 PROPRIEDADES QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO RÓDIO

Compostos baseados em ródio têm tido destaque devido as suas interessantes propriedades químicas, principalmente no que diz respeito ao seu potencial redox, o que favorece sua capacidade de ligação a biomacromoléculas com alta especificidade, e biológicas, por exemplo, capacidade de interagir com enzimas. Esta perspectiva destaca estudos antigos e recentes de complexos de ródio que mostram diversas atividades biológicas contra vários alvos (MA et al., 2016; ZHONG ET AL., 2012).

Na forma metálica, o ródio é um elemento de coloração prateada, compacto, maleável, sendo um dos seis elementos químicos que constituem o grupo da platina (platina-Pt, paládio-Pd, irídio-Ir, ósmio-Os, rutênio-Ru e ródio-Rh). É um metal de transição com símbolo químico Rh e pertence ao grupo 9 da tabela periódica. Apresenta número atômico 45, massa molar 102,9 g.mol⁻¹, densidade 12,45 g.cm⁻³, ponto de fusão 1964 °C, ponto de ebulição 3995 °C e, portanto, é sólido à temperatura ambiente (ALVES; SILVA; GUERRA, 2010).

O ródio metálico é completamente insolúvel em todos os ácidos, incluindo misturas de ácido nítrico e ácido clorídrico (água régia). Entretanto, o negro de ródio produzido por redução de sais de ródio é solúvel em água régia, ácido sulfúrico concentrado a quente e em ácido clorídrico na presença de ar. É um metal altamente resistente à corrosão, não sofre influência

de ácidos fortes, embora quando aquecido, possa reagir com cloro e bromo e ocorrer sua oxidação (ALVES; SILVA; GUERRA, 2010).

Os metais de transição são assim definidos, baseado no preenchimento dos níveis eletrônicos dos elementos. Para o ródio, o seu subnível *d*, apresenta-se apenas parcialmente preenchido no átomo neutro ou em seus íons metálicos. Um aspecto muito importante destes elementos é a existência de diversos estados de oxidação. A grande maioria dos seus compostos apresenta-se como elementos trivalentes, apesar de ocasionalmente serem encontrados nos estados de valência +1, +2, +4 e +6 (ALVES; SILVA; GUERRA, 2010).

Para aplicações biológicas, o átomo de ródio trivalente (III) é o mais amplamente utilizado; nesta configuração ambos os elétrons *s* e um elétron *d* estão envolvidos em ligações químicas. Estes elementos apresentam uma grande tendência em formar compostos de coordenação com bases de Lewis, isto é, com grupos capazes de doar um par de elétrons. Esta capacidade destes elementos para formar complexos está relacionada com o fato de formarem íons pequenos com carga elevada, contendo orbitais vazios de baixa energia, capazes de receber pares de elétrons dos grupos ligantes (ALVES; SILVA; GUERRA, 2010).

Fan e colaboradores (2019) avaliaram o potencial antitumoral do complexo organometálico contendo Rh (I). Estudos *in vitro* mostraram que o complexo apresentou atividade antiproliferativa frente às linhagens de células cancerosas (MCF-7 e HepG2) e além disso, reduziu o volume do tumor no modelo *in vivo* em camundongos.

Além da atividade antitumoral, mais recentemente, os complexos de ródio também foram explorados para aplicações anti-inflamatórias. Em 2012, Zhong e colaboradores desenvolveram o primeiro complexo ciclometalado de Rh (III) com atividade inibidora da enzima de ativação de NEDD8 (NAE). A NAE é uma enzima que desempenha um papel análogo à enzima ubiquitina E1 do sistema ubiquitina-proteassoma, ativando o NEDD8 e mediando a sua posterior transferência para Ubc12. Conseqüentemente, a inibição específica do NAE poderia modular a taxa de ubiquitinação e a subsequente degradação de substratos, como I κ B α e p27, estas são proteínas que desempenham papéis significativos na replicação e reparo do DNA, sinalização de NF- κ B, progressão do ciclo celular e inflamação (DEBRECZENI et al., 2006; MILHOLLEN et al., 2010; ZHONG et al., 2012).

Moragues e colaboradores (2013) relataram o complexo binuclear de Rh (II) como um inibidor do NO em macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS. Encontrar a redução de NO por esta substância pode indicar um uso potencial para o tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite, entre outras.

Em 2014, Liu e colaboradores sintetizaram uma série de complexos ciclometalados de Rh (III) e demonstraram atividades biológicas contra alvos diversos, incluindo enzima e interação proteína-proteína. O complexo inibiu a atividade do NF- κ B e reprimiu a degradação dos substratos como, I κ B α e p27 em células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), o que foi atribuído à sua capacidade de inibir a atividade da NAE em células.

Zhong e colaboradores (2017) sintetizaram e avaliaram *in vivo* uma nova classe de compostos ciclometalados de Rh (III) com potentes atividades inibitórias da NAE em camundongos com doenças inflamatórias intestinais. Além disso, o complexo diminuiu a atividade de NF- κ B em células Caco-2. Nesse trabalho, a citotoxicidade do complexo em relação às células Caco-2 foi estudada utilizando o ensaio de MTT. O complexo diminuiu o crescimento celular com um valor IC₅₀ de 4,3 μ M. O complexo também antagonizou NF- κ B, que foi relacionada ao acúmulo de I κ B α induzido pelo complexo de Rh (III). O complexo ainda inibiu a liberação de TNF- α e IL-1 β induzido por LPS e nigericina em macrófagos RAW 264.7 de maneira dose-dependente.

Neste mesmo estudo conduzido por Zhong e colaboradores (2017), avaliaram a potencial utilização de compostos de Rh (III) em doenças inflamatórias intestinais. Para isto, induziram a colite com uma solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico em camundongos C57BL/6. O índice de atividade (DAI) foi determinado pela medida do corpo, perda de peso e consistência das fezes, com valores maiores de DAI correlacionados com sintomas mais graves. Os camundongos colíticos tratados com o complexo de Rh (III) mostraram uma média DAI máxima significativamente menor, indicando melhora da doença inflamatória induzida. Os complexos reduziram os níveis dos mediadores inflamatórios TNF- α , mieloperoxidase e IL-1 β em tecidos do cólon dos camundongos tratados (ZHONG et al., 2017).

Considerando os resultados obtidos em estudos anteriores com complexos de Rh (III) com atividade imunomoduladora, é de grande relevância explorar as possíveis atividades biológicas do ródio não complexo e desenvolver novos complexos com este elemento, que poderão apresentar atividade biológica mais acentuada, em função do aumento de sua biodisponibilidade.

Uma classe de compostos promissores para esta finalidade são as ciclodextrinas, que são capazes de formar complexos supramoleculares com diversas substâncias.

2.4 SISTEMAS SUPRAMOLECULARES

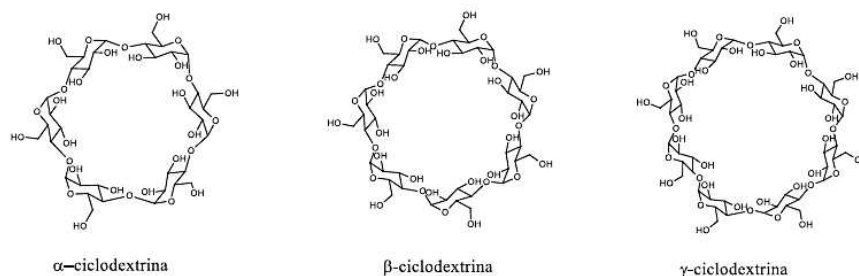
A indústria farmacêutica tem buscado ampliar e aprimorar o seu arsenal terapêutico através de inovações tecnológicas que utilizem de nanotecnologias para desenvolver novos medicamentos ou até mesmo melhorar características de medicamentos já existentes (SANNA et al., 2013).

Dentro da perspectiva de novas formulações, a nanotecnologia surge como um conjunto de técnicas que permite a manipulação de objetos e dispositivos em dimensões moleculares, na ordem nanométrica, buscando assim utilizar as diferentes propriedades físico-químicas que surgem, quando os materiais se encontram nessa escala, para desenvolver novos dispositivos tecnológicos com funções diferenciadas (SANNA et al., 2013; SANTOS et al., 2019).

Diversos tipos de nanoestruturas são empregados pela indústria farmacêutica como método de encapsulamento de fármacos, sendo os principais, os lipossomas (KUMARI et al., 2014; NII; ISHII, 2005), nanopartículas poliméricas (PATEL et al., 2012), nanopartículas lipídicas (SOMA et al., 2017) e as ciclodextrinas (CDs) (KURKOV; LOFTSSON, 2013). Apesar de todos esses métodos estarem bem empregados e aceitos, as CDs têm se consolidado no mercado farmacêutico devido seu baixo custo, grande disponibilidade e baixa toxicidade (VENTURINI et al., 2008). Por esse motivo as associações com CDs já foram estudadas em inúmeros princípios ativos, como dexametasona (LOFTSSON; STEFANSSON, 2002) e budesonida (DUFOUR et al., 2015), otimizando diversas características dos fármacos, como estabilidade, biodisponibilidade e segurança.

As CDs são oligossacarídeos cíclicos consistindo de unidades glicosídicas que adotam uma conformação em cadeira e estão unidas entre si através de uma ligação C-O-C do tipo α 1-4. Os tipos de CD's naturais mais comuns e os únicos utilizados em produtos farmacêuticos são a α , β e γ , possuem 6,7 e 8 unidades glicosídicas respectivamente (Figura 2) (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Figura 2— Estrutura química das ciclodextrinas (α , β e γ CD) naturais.



Fonte: Adaptado de BOOIJ, 2009.

No Quadro 1 estão apresentadas suas principais características. São produzidas através da degradação enzimática do amido por uma enzima denominada *ciclodextrina glicosil transferase*, presente em alguns tipos de micro-organismos, como o *Bacillus (B.) macerans*, *B. megaterium*, *B. circulabs*, *Micrococcus varians*, *Klebsiella pneumoniae* (HEDGES, 1998; SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997).

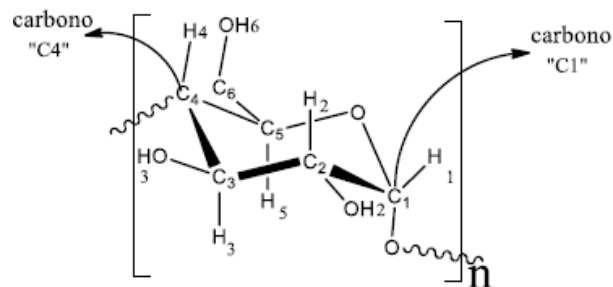
Quadro 1—Características das principais ciclodextrinas naturais.

CD	Nº de Monômeros	Altura da Molécula	Diâmetro Interno (Borda superior)	Diâmetro Externo (Borda superior)	Massa Molar	Solubilidade
α CD	6	7,9 Å	5,7 Å	13,7 Å	972,8 g/mol	149,2 mmol/L
β CD	7	7,9 Å	7,8 Å	15,3 Å	1135,0 g/mol	16,3 mmol/L
γ CD	8	7,9 Å	9,5 Å	16,9 Å	1297,1 g/mol	178,8 mmol/L

Fonte: Adaptado de SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997.

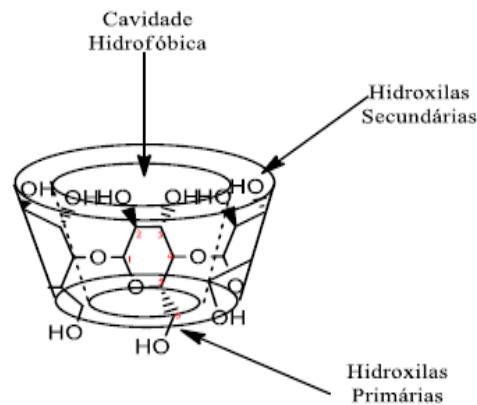
A estrutura das CDs foi elucidada por estudos de raio X, onde foi observado a disposição espacial das unidades de glicopiranosose, com conformação em cadeia (Figura 3) e assemelha-se a um cone truncado (Figura 4), possui uma cavidade capaz de receber diversas substâncias em seu interior (DEL VALLE, 2004; KURKOV; LOFTSSON, 2013). O tamanho desta cavidade varia com o tipo de CD, pois o número de unidades glicosídicas determina o diâmetro interno e o volume do orifício (DEL VALLE, 2004).

Figura 3— Representação estrutural de uma unidade glicosídica na conformação de cadeia.



Fonte: Adaptado de SZEJTLI, 1998.

Figura 4— Representação esquemática da estrutural funcional das ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de DEL VALLE, 2004.

O interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos C3 e C5 e pelo oxigênio da ligação éter C1-O1-C4. O par de elétrons não ligante do oxigênio das ligações glicosídicas está orientado para o interior da cavidade produzindo uma elevada densidade eletrônica conferindo-lhes algum caráter de base de Lewis. Além disso, a cavidade central das CDs não se encontra vazia, estando ocupada por moléculas de água. Essas moléculas de água presentes na cavidade das CDs podem formar ligações de hidrogênio com os grupos presentes na cavidade (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

Entretanto, devido a tensão do anel, essas interações não são totalmente satisfeitas, resultando em ligações de hidrogênio anômalas e de alta energia em relação às ligações de hidrogênio convencionais. Esse confinamento desfavorável das moléculas de água na cavidade das CDs, somadas a presença dos grupamentos C-H, fazem com que essa região da molécula apresente um caráter hidrofóbico (SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997).

A face externa das CDs é composta por um maior número de hidroxilas (OH), essas hidroxilas atribuem a esta região um caráter hidrofílico pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio e se solubilizam com a água. Essa disposição espacial das CDs resulta em ambientes com polaridades distintos em uma mesma molécula, ou seja, podendo então ser consideradas moléculas anfifílicas (KURKOV; LOFTSSON; 2013).

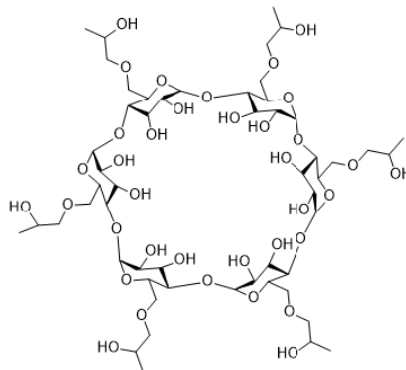
Dentre as CDs naturais, a β CD é a mais utilizada em formulações farmacêuticas devido ao tamanho da sua cavidade, podendo assim acomodar uma grande quantidade de moléculas em seu interior, além de apresentar a melhor relação custo-benefício em relação às outras

moléculas disponíveis comercialmente (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; LOFTSSON; DUCHENE, 2017).

Apesar dessas vantagens a β CD apresenta menor solubilidade devido ao comprometimento dos grupos hidroxílicos secundários em ligações de hidrogênio intramoleculares. Estas interações tornam a estrutura rígida e impedem a sua hidratação pelas moléculas de água (KURKOV; LOFTSSON, 2013). Baseado no grande interesse de sua utilização e nas limitações impostas pela redução da solubilidade, a partir das CD's naturais foi possível introduzir modificações químicas nos grupos hidroxílicos primários e secundários, por intermédio da ligação de diversos grupos funcionais, e assim melhorar a solubilidade, a toxicidade e aumentar a capacidade de inclusão de seus derivados. Os derivados de CD's podem ser obtidos, principalmente, pela substituição com grupos metila, sulfobutila e hidroxipropila (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

A hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) (Figura 5) deriva-se da substituição dos grupos hidroxílicos em C2, C3 e C6 por substituintes 2-hidroxipropil. A derivação das CD's naturais oferece eficiências de complexação, geralmente superiores, devido ao prolongamento do espaço hidrofóbico da cavidade das CD's, promovido pela introdução dos substituintes (KURKOV; LOFTSSON, 2013). Os derivados hidroxipropilicos apresentam hidrossolubilidade elevada e menor higroscopicidade quando comparados a CD's de origem e, por esse motivo, na presença de umidade, dissolvem-se na água adsorvida (LOFTSSON; BREWSTER, 2012; KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Figura 5— Estrutura química da HP β CD.



Fonte: Adaptado de LOFTSSON; BREWSTER, 2012.

A estrutura de cone truncado oco das CD's, abertas em ambas as extremidades, e rica em grupos hidroxílicos em sua fase externa permite a inclusão de uma ampla variedade de moléculas, como moléculas hidrofóbicas, moléculas organometálicas e íons metálicos. A associação das moléculas hospedeiras (CD) com hóspedes (fármacos) resulta na formação de complexos de fármaco-ciclodextrinas (PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

As características do complexo final formado são dependentes das propriedades do hóspede a ser complexado e das interações de associação estabelecidas entre eles. Diversas estruturas podem ser obtidas, como complexos de inclusão (CI) (KURKOV; LOFTSSON, 2013), quando as CDs recebem em suas cavidades, moléculas orgânicas ou organometálicas; ou ainda, compostos de coordenação (CC), quando as CDs interagem diretamente com centros metálicos (PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

De acordo com a definição, CI são estruturas supramoleculares formadas por duas ou mais moléculas distintas que se auto-organizam sem que alguma delas perca sua identidade química (LOFTSSON; DUCHENE, 2007). Diversas forças intermoleculares estão envolvidas na formação do CI e contribuem para a estabilização dos mesmos, sendo elas interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas. Na formação destes complexos, as moléculas de água do interior da cavidade das CDs são substituídas pelas moléculas da substância hóspede, mais hidrofóbicas, obtendo uma associação mais energeticamente favorável (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Conforme citado, complexos de coordenação entre CDs e metais (M) surgem como resultado de um novo modelo supramolecular de organização das CDs, onde as moléculas interagem diretamente com metais solvatados ou com centros metálicos complexados a algum ligante. Nestes complexos as CDs atuam como ligantes de coordenação, e a complexação é impulsionada por vários fatores, sendo o principal, a formação da ligação covalente M-CD, além das forças de Van der Waals, e fatores entrópicos de solvatação/dessolvatação (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

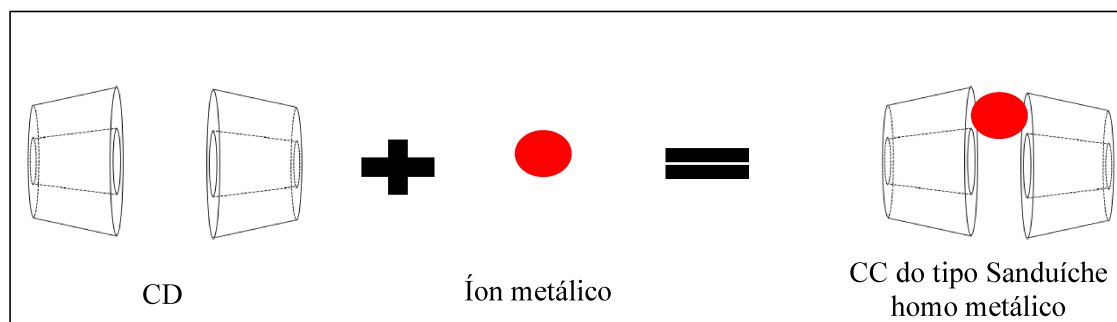
Os complexos de coordenação de CDs com compostos organometálicos são mais explorados em relação à complexação direta com centros metálicos, uma vez que a reação de complexação é a que mais se aproxima dos métodos de obtenção de CI convencionais, onde a interação entre as moléculas é estabelecida baseada na capacidade das CDs em alojar uma parte apolar do composto em sua cavidade hidrofóbica interna, enquanto sua fase externa rica em OH secundárias interage com o íon metálico do composto, formando assim um complexo de coordenação organometálico. A revelação da ligação do íon metálico diretamente aos grupos OH da fase externa da CD impulsionaram as pesquisas para obtenção de novos complexos,

onde o íon metálico esteja ligado diretamente na CD (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

As CD possuem na sua fase externa um grande número de OH primárias e secundárias que podem fornecer variados locais de coordenação para quelar íons metálicos e formar ligações covalentes, onde os grupos OH podem ser desprotonados e agir como nucleófilos. Vários complexos podem ser formados, desde sistemas monoméricos e dinucleares, complexos tipo sanduíche homo e heterometálico até estruturas cilíndricas. O caráter do íon metálico, o método de preparação utilizado e a estabelecimento de ligações de hidrogênio intra e/ou intermoleculares podem influenciar no modo de agregação e arranjo supramolecular dos complexos metálicos resultantes (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

A estrutura básica de complexo com metal de transição consiste de um íon metálico central ligado via ligação covalente a um ou mais compostos orgânicos, podendo adotar diversas geometrias, dependendo do número de coordenação do íon metálico (LEUNG et al., 2015). Nos complexos do tipo sanduíche homo metálico (Figura 6), o íon metálico é conectado por duas CDs através dos átomos de oxigênios desprotonados. Por sua vez, reações de sais metálicos com CDs na presença de íons metálicos alcalinos (Li^+ , Na^+ , K^+) favorece a formação de complexos do tipo sanduíche hetero metálicos, onde a distribuição de íons metálicos pode aparecer em diferentes padrões dependendo do número de sítios de coordenação em uma molécula de CD e o caráter dos íons auxiliares utilizados. Análises estruturais revelaram que os complexos do tipo sanduíche podem formar diversos tipos de arquiteturas supramoleculares, variando de estruturas fechadas não porosas a redes em camadas mais estendidas (PROCHOWICZ et al., 2016; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWINSKI, 2017).

Figura 6 — Representação esquemática da formação do complexo do tipo sanduíche homo metálico.



Fonte: Adaptado de PROCHOWICZ et al., 2016.

Legenda: CD: ciclodextrinas; CC: complexo de coordenação.

A coordenação de íons metálicos por β CD foi amplamente investigada por Matsui e colaboradores (MATSUI; KURITA; DATE, 1972; MATSUI et al., 1975). Estes autores relataram a preparação dos complexos de Cobre (II) (Cu (II)) com β CD em meio alcalino com base em estudos espectroscópicos. A evidencia do estabelecimento de ligações covalentes entre o Cu (II) e β CD foi demonstrada com base em estudos de dicroísmo circular, mudanças significativas observadas nos espectros do complexo de Cu (II)/ β CD sugeriram o estabelecimento de ligação covalente entre o íon metálico Cu (II) e os grupos OH das CDs. Entretanto, apenas números limitados de complexos metálicos com β CD estruturalmente caracterizados são relatados na literatura.

No processo de complexação, a constante de equilíbrio (K_{eq}) do complexo é um parâmetro de alta relevância, pois através da mesma é possível inferir o grau de afinidade e ligação entre as duas espécies. Os valores considerados adequados para aplicações do complexo em sistemas biológicos variam entre 50 e 20000. Complexos poucos estáveis ($K_{eq} < 50$) apresentam como problema uma liberação muito rápida da substância, enquanto que os muitos estáveis ($K_{eq} > 20000$) apresentam dificuldades na liberação, apesar da resposta biológica somente poder ser atestada mediante ensaios biológicos (DEL VALLE, 2004).

O processo de complexação é geralmente espontâneo. Porém, como a constante pode ser baixa, é interessante aumentar a eficiência de encapsulamento através da remoção do solvente. Assim, a produção de complexos de inclusão ou coordenação com maior eficiência pode ser realizada pelo método de coprecipitação seguida de liofilização, na qual a substância hospede é adicionada a uma solução de CDs que se encontra sob agitação. Posteriormente, o complexo formado é recolhido e o solvente removido, por exemplo, pelo método de liofilização (PASSOS et al., 2012).

A formação dos complexos implica em alterações em variadas características físico-químicas das moléculas hóspedes, que facilitam suas aplicações em sistemas biológicos. Como exemplo de melhorias é relevante citar o aumento da estabilidade química, frente à degradação (no caso de moléculas orgânicas) ou oxidação (de metais) induzida pela temperatura ou radiação ultravioleta, além disso, inibição do cheiro e/ou sabor indesejado e liberação modificada da substância (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Para a avaliação dessas alterações físico-químicas dos complexos formados empregam-se algumas técnicas analíticas de caracterização de biomoléculas, tais como análise térmica diferencial (DTA), calorimetria de varredura diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria isotérmica de titulação (ITC), técnicas espectroscópicas na região do

infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), além de técnicas de equilíbrio de fases como solubilidade.

Diante do exposto, os complexos de ródio (III) com β CD e HP β CD foram sintetizados, caracterizados e avaliados em relação ao seu potencial imunomodulador.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar o potencial imunomodulador *in vitro* e *in vivo* do ródio (III) e dos complexos de coordenação de ródio (III) com ciclodextrinas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os complexos de ródio (III) com β -ciclodextrina (Rh(III)/ β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (Rh(III)/HP β CD);
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e o ródio (III) no estado sólido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR);
- Avaliar a estabilidade térmica dos complexos de coordenação por análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA);
- Avaliar as interações intermoleculares entre as ciclodextrinas e o ródio (III) em solução aquosa por ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H);
- Avaliar a estrutura supramolecular dos complexos, por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ);
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de complexação (entalpia- ΔH^0 , entropia- $T\Delta S^0$, energia livre de Gibbs- ΔG^0 e constante de equilíbrio- K_{eq}), através da técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC);
- Verificar a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com o ródio (III) e com os complexos de coordenação (Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD);
- Dosar óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com o ródio (III) e com os complexos de coordenação (Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD);
- Avaliar a expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com o ródio (III) e com os complexos de coordenação (Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD) por citometria de fluxo;
- Avaliar o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos BALB/c tratados com o ródio (III) e com os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES UTILIZADOS

A β CD e HP β CD foram obtidas da Cerestar Company (Hammond, Indiana, USA). Os reagentes químicos RhCl_3 , D_2O , brometo de potássio, dimetilsulfóxido, corante MTT, meio de cultura RPMI-1640, soro bovino fetal, penicilina/estreptomicina, tripsina, reagentes para NO e carragenina foram adquiridos das empresas idôneas Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O kit para detecção do NF- κ B por citometria de fluxo foi adquirido da empresa BD Biosciences Pharmingen (São Diego, CA, USA). A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi cedida pelo Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (Imunocet –UFJF), e o macrófago J774A.1 foi adquirido no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o intuito de facilitar a compreensão do trabalho, elaboramos um fluxograma no qual estão apresentadas as etapas de síntese, caracterização e os ensaios biológicos realizados (Figura 7). Para o melhor desenvolvimento do trabalho o mesmo foi estruturado em duas partes, sendo elas a etapa de síntese e caracterização e a fase de ensaios biológicos. Na etapa de caracterização dos complexos de coordenação, as análises foram divididas de acordo com o estado físico do sistema. Os ensaios biológicos também foram divididos em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

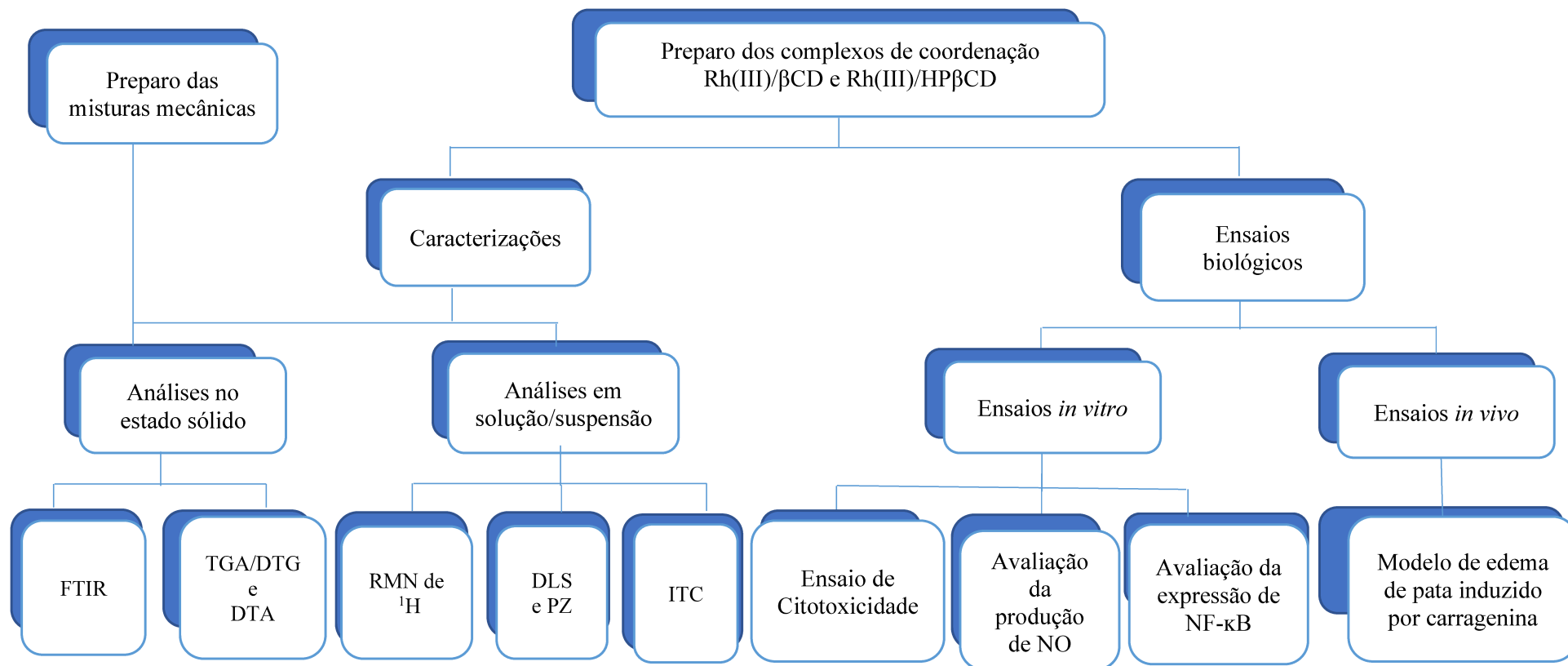
4.3 PREPARO DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO E MISTURAS MECÂNICAS

Os complexos de coordenação foram obtidos por reação espontânea entre os precursores, utilizando quantidades equimolares, 5 mM do Rh (III) e 5 mM de cada ciclodextrina (β CD e HP β CD). Após a mistura, os compostos foram congelados a - 20 °C e liofilizados, de maneira similar ao realizado para preparar complexos de inclusão convencionais (PASSOS et al., 2012). Esta proporção foi escolhida após a determinação da estequiometria por Calorimetria Isotérmica de Titulação, citado no item 6.1.3; e após caracterização coloidal por titulações por Espalhamento de Luz Dinâmico, Potencial Zeta e Condutimetria, citada nos itens 6.1.3-6.1.6.

Em béqueres separados, foram preparadas soluções aquosas do cloreto de Rh (III) e ciclodextrinas na mesma concentração molar. A solução da molécula hóspede foi adicionada às soluções de ciclodextrinas e mantidas sob agitação por 24 horas. As soluções formadas foram congeladas a - 20 °C e, posteriormente liofilizadas por 4 dias.

As misturas mecânicas (MM) contendo Rh (III) e ciclodextrinas foram preparadas na proporção molar de 1:1. Após pesados, o Rh (III) e as CDs foram homogeneizados em grau de porcelana com auxílio de pistilo, posteriormente foram acondicionados em microtubos e armazenados a - 4 °C. Esta MM foi utilizada para comparação nas análises no estado sólido (PASSOS et al., 2012).

Figura 7—Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

4.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho (IV) médio (4000 a 400 cm^{-1}) das CDs, das misturas mecânicas (MM) e dos complexos de coordenação (CC) foram registrados em equipamento de infravermelho da PerkinElmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum TwoTM, a partir de pastilhas de Brometo de potássio (KBr). Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para aquisição e processamento dos espectros foi utilizado o programa PerkinElmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição (PASSOS et al., 2012).

4.4.2 Análise Térmica: termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

As Análises Termogravimétricas (TGAs) e Análises Térmicas Diferenciais (DTAs) para o cloreto de ródio (RhCl_3 (III)), CDs (βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$), complexos de coordenação e as respectivas misturas mecânicas (MM's) foram realizadas no módulo termoanalítico da Hitachi STA7200RV. Os experimentos foram conduzidos com rampa de temperatura de 30 °C a 900 °C e uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, com massa aproximada de 5,0 mg do composto a ser analisado em cadinho de platina. Como referência, foi utilizado o cadinho de platina vazio. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição (adaptado de PASSOS et al., 2012).

4.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

As análises de RMN de ^1H do Rh (III) puro, das CDs e dos CC's foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker DRX4000- série *AVANCE*, a 400 MHz, no Departamento de Química da UFMG. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D_2O). Os espectros foram editados utilizando o programa MestReNova® 12.0 (PASSOS et al., 2013).

4.4.4 Titulações calorimétricas isotérmicas (ITC)

Os parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação dos complexos de coordenação em solução foram determinados a partir da titulação calorimétrica isotérmica envolvendo o ligante Rh (III) e as CDs, a 25 °C. O experimento foi realizado utilizando um Microcalorímetro VP-ITC da Microcal e os seguintes parâmetros experimentais: rotação de 300 rpm, tempo de injeção de 2 segundos, tempo de equilíbrio de 5 minutos, 41 injeções automáticas de 5 µL de titulante e 1,5 mL do titulado. Temperatura dos experimentos 25 °C, rotação de 300 rpm. A primeira injeção de 1 µL foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula e vice-versa. O titulante consistiu na solução aquosa do Rh (III) a 60,0 mM, e o titulado foi a solução das CDs a 4,0 mM no mesmo solvente. Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos no objetivo de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos compostos com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0 (PASSOS et al., 2013).

4.4.5 Fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial zeta (PZ)

O comportamento supramolecular dos complexos Rh(III)/βCD e Rh(III)/HPβCD foi avaliado por medidas de diâmetro hidrodinâmico (D_h) por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25° C ±1,0 °C, com termostatização via sistema Peltier. 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 4mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada e medida a 90°. O D_h foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtidas a partir da média de 5 contagens. Para os experimentos, foram preparadas soluções aquosas na concentração de 60 mM para Rh (III) e 4 mM para as CDs. A seguir, foram realizadas 25 injeções (10 injeções de 5µL e 20 injeções de 10 µL) do Rh (III) a 60 mM em 1,5 mL da solução das CDs a 4 mM (adaptado de SOUSA et al., 2012). O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

Na determinação do potencial zeta (ZP) das estruturas supramoleculares, foram preparadas soluções similares às utilizadas no experimento de tamanho hidrodinâmico, anteriormente citado. As soluções foram adicionadas a uma cubeta de polietileno, a qual é

imersa a célula de medida (Dip Cell) e avaliada pelo módulo Zetasizer Nano-ZS 90 através da técnica de micro-eletoforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a 173° e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski (adaptado de SOUSA et al., 2012). O valor final do potencial zeta foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada e o tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Etapa *in vitro*

4.5.1.1 Cultura de RAW 264.7 e J774.A1

Macrófagos murinos RAW 264.7 e J774.A1 foram cultivados em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 1 % de aminoácidos essenciais e 0,5 % de solução penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10.000 mg/mL, respectivamente). Após atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL para o ensaio de viabilidade por MTT e dosagem de NO pelo método de Griess, e 1×10^6 células/mL para análise de expressão de NF- κ B. As células foram então incubadas em atmosfera úmida de 5 % de CO₂ a 37 °C (CASTRO et al., 2012).

4.5.1.2 Avaliação da citotoxicidade do Rh (III) e dos complexos de coordenação em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1

A viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*- Sigma, St, Louis, MO, USA). Para o teste, após o tempo de tratamento de 03 e 48 horas, os sobrenadantes da cultura celular de macrófagos tratados com Rh (III), ciclodextrinas puras (β CD ou HP β CD) e complexos de coordenação (Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD) nas concentrações de 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M foram descartados e a seguir 100 μ L de RPMI-1640 foram adicionados em todos os poços, e por fim adicionados 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5 % de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de 100 μ L de DMSO. A leitura foi feita

em leitor de microplaca *Multiskan™ FC* Microplate Photometer (adaptado de CASTRO et al., 2012) com comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram inseridos e analisados no programa Prism 6.0 (GraphPad) e considerados significantes quando $p < 0,05$ (adaptado de CASTRO et al., 2012).

Para a determinação do IC_{50} , valor da concentração que inibe o crescimento celular em 50 % comparado ao grupo não tratado, foram testadas concentrações de 1200 μM , 600 μM , 300 μM , 100 μM e 50 μM dos compostos.

4.5.1.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com o Rh (III) e com complexos de coordenação

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess (TSIKAS, 2007), no sobrenadante de 48 horas de cultura de macrófagos RAW 264.7 e J774 A.1 estimulados com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IFN- γ (9 ng/mL) e tratados com Rh (III), CDs ou complexos de coordenação nas concentrações de 300 μM , 100 μM e 50 μM . Para controle foram utilizadas células estimuladas não tratadas e células não estimuladas e não tratadas.

Para realização do teste 100 μL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1 % de sulfanilamida, 0,1 % de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5 % H_3PO_4 , Sigma, St, Louis, MO, USA). A produção de nitritos foi quantificada pela comparação com uma curva padrão com diferentes concentrações de nitrito de sódio (NaNO_2). A absorbância medida a 540 nm. A porcentagem de produção de NO foi calculada levando em consideração o controle de produção, células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- γ (CASTRO et al., 2012).

4.5.1.4 Avaliação da expressão de NF- κB por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh (III) e com os complexos de coordenação por citometria de fluxo

Para a análise da expressão de p65 (indiretamente NF- κB) as células foram cultivadas na presença ou ausência do ródio (III) puro, CDs ou CCs nas concentrações de 300 μM , 100 μM e 50 μM . A cultura de macrófagos RAW 264.7 ou J774A.1 (1×10^6 células/ mL) estimulados ou não com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IFN- γ (9 ng/mL) foram mantidas por 3 horas (PATIL et al., 2015). Transcorridos os tempos de cultura as células foram removidas e a marcação de NF- κB processada conforme o kit do fabricante (NF-KPA-B (PS529)-PE 558423,

BD, Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), as células foram adquiridas no FACS Verse e analisadas no software FCS express.

4.5.2 *Etapa in vivo*

4.5.2.1 Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD no modelo in vivo da indução de edema de pata de camundongos pela carragenina

4.5.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmea, com peso médio de 25 gramas, 6 a 8 semanas de idade e fornecidos pelo Núcleo de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha de pinus autoclavada, sendo 05 animais por gaiola de 30,5 cm de comprimento x 19,7 cm de largura x 20 cm de altura em estantes ventiladas, com exaustão do ar. Receberam água filtrada e clorada e ração própria industrializada da marca NUVILAB-CR1, disponíveis à vontade. Todo experimento foi conduzido de acordo com os princípios do Código de Ética Brasileiro para Utilizações de Animais de Laboratório. Experimentação aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – campus Mucuri (Protocolo 01/2019R).

4.5.2.3 Preparação e utilização dos compostos para teste in vivo

O Rh (III), os complexos de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD e a dexametasona 2 mg/comprimido, foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS). O Rh (III), e os complexos foram testados na concentração de 5 mg/Kg (ZHONG et al., 2016).

4.5.2.4 Indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com o Rh (III) e com os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD

Inicialmente os camundongos foram pesados, divididos em sete grupos (n= 5 animais/grupo), conforme descrito abaixo (Quadro 2), e suas patas medidas com paquímetro (0 h). Animais tratados com dexametasona foram utilizados pela conhecida atividade anti-inflamatória (ABRAHAM et al., 2006). Trinta minutos antes da indução do edema nas patas,

os camundongos foram tratados por via intraperitoneal (100 μ L) com PBS, dexametasona (0,5 mg/kg), com Rh (III) (5 mg/Kg), com β CD (5 mg/Kg), com HP β CD (5 mg/Kg), com Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg), ou com Rh(III)/HP β CD (5 mg/Kg). A carragenina (2,5 %) foi dissolvida em PBS, e 20 μ L foi injetado no coxim plantar da pata esquerda e 20 μ L de PBS no coxim plantar da pata direita como controle de fidelidade. Os camundongos foram divididos em 7 grupos experimentais (n = 5 animais/grupo):

Quadro 2 – Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos tratamentos.

Grupo	Tratamento
I	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com PBS
II	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com dexametasona (0,5 mg/kg)
III	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com Rh (III) (5 mg/Kg)
IV	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com β CD (5 mg/Kg)
V	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com HP β CD (5 mg/Kg)
VI	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg)
VII	Induzido com carragenina (2,5 %) e tratado com Rh(III)/HP β CD (5 mg/Kg)

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

As patas direitas e esquerdas foram medidas 1, 2 e 3 horas após a injeção da carragenina, e a diferença entre as patas calculada pela fórmula: [Edema pata (mm)] = [medida pata injetada com carragenina (mm) – medida pata injetada com PBS (mm)]. As patas foram medidas com medidor de espessura digital (serie 547; 7300, Mitutoyo, Japão). Os camundongos foram eutanasiados sob anestesia intraperitoneal após a 4ª hora de leitura.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos independentes e são mostrados como média \pm erro padrão. Os dados foram inseridos e analisados no programa Prism 6.0. A significância de diferença foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis e considerados significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO

5.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) é uma técnica importante na caracterização de moléculas no estado sólido. É capaz de detectar as variações do momento de dipolo elétrico das ligações químicas decorrente dos movimentos vibracionais. A técnica é sensível aos diferentes tipos de vibrações entre os átomos de uma molécula de acordo com suas ligações interatômicas (FORATO et al., 2010).

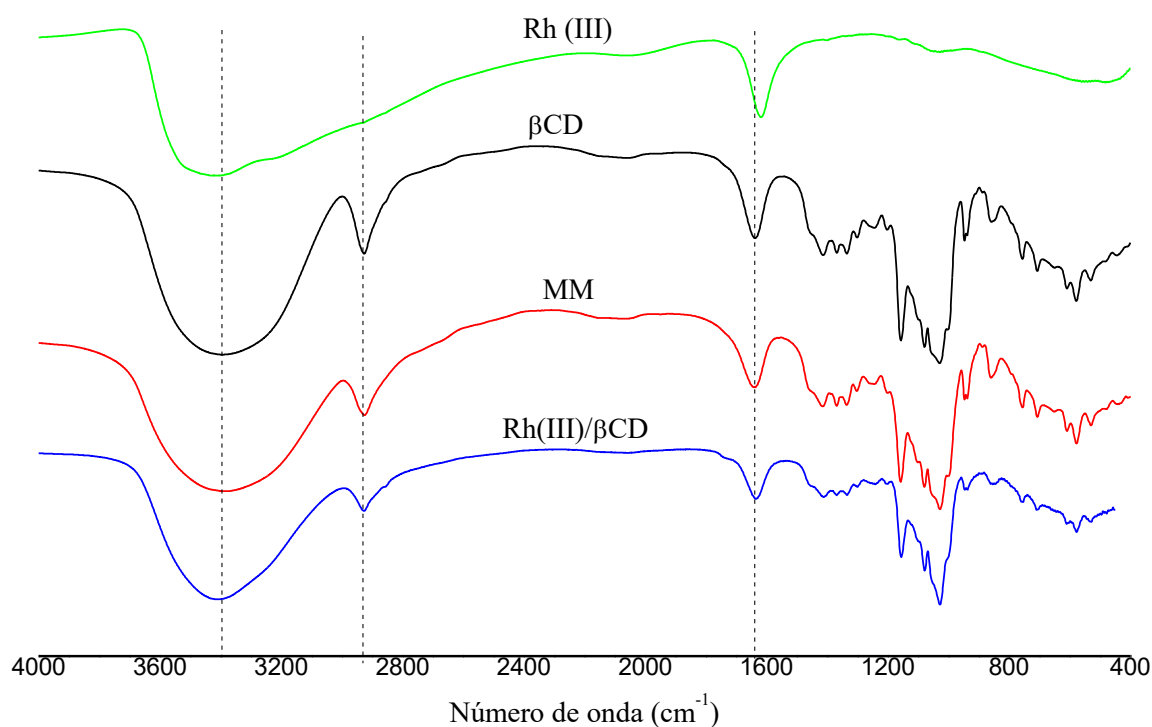
No processo de formação de complexos de coordenação, moléculas se conectam através de ligações químicas (fortes) e interações intermoleculares (fracas), as quais alteram a distribuição eletrônica sobre os núcleos atômicos envolvidos. Como consequência, podem ocorrer alterações no momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais destas moléculas. Essas alterações podem provocar aumento ou redução da intensidade de absorção das bandas, restrição ou intensificação do movimento vibratório refletindo no espectro de IV como redução da intensidade, deslocamento ou supressão de bandas (SUAREZ et al., 2014). Diante do exposto, foram identificadas as interações entre o Rh (III) e as CDs no estado sólido, através da comparação dos espectros de FTIR das CDs, das MM e dos complexos de coordenação.

Na Figura 8 estão representados os espectros de IV do Rh (III), da β CD, da MM e do complexo de Rh(III)/ β CD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr; enquanto que na Figura 9, os correspondentes espectros para o sistema Rh(III)/HP β CD. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais bandas observadas para a β CD, MM e Rh(III)/ β CD, enquanto que na Tabela 2 estão apresentados resultados similares para o sistema Rh(III)/HP β CD.

Conforme observado nas Figuras 8 e 9, o espectro referente ao Rh (III) praticamente não apresenta bandas de absorção na região do infravermelho médio, e as bandas de absorção apresentadas em 3427 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} são referentes ao estiramento O-H e deformação respectivamente, de moléculas de água de hidratação.

Para ambos os sistemas, a MM foi preparada para demonstrar que o complexo de coordenação apresenta características físico-químicas diferentes do que é observado em apenas uma mistura dos dois compostos isolados, sendo necessário um tempo de contato entre as espécies em solução, para que a interação ocorra.

Figura 8—Espectros de infravermelho do Rh (III), β CD, MM e Rh(III)/ β CD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh (III): ródio (III); β CD: β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação ródio(III)/ β -ciclodextrina; KBr: brometo de potássio.

Na Figura 8, o espectro da β CD está de acordo com o registro da literatura, sendo possível observar suas bandas características com principais absorções em 3396 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , e 947 cm^{-1} associadas ao estiramento OH, estiramento C-H, vibração C-O e vibração envolvendo a ligação α -1,4 respectivamente (YUAN; LIU; LIU, 2015).

Na MM ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a β CD isolada (Tabela 1). O perfil observado pode ser justificado pelo fato de que mesmo no estado sólido é possível que ocorra interação entre as moléculas. No espectro do Rh(III)/ β CD é possível observar modificações das bandas, tais como redução da intensidade de absorção da banda da β CD a 3396 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} , devido ao estabelecimento de um novo padrão de ligações; atenuação das bandas em 1635 cm^{-1} e 947 cm^{-1} da β CD. Estas alterações sugerem que o complexo de coordenação foi formado, pois a presença do Rh (III) ligado a fase externa da β CD promove a saída de moléculas de água e reduz o número de ligações de hidrogênio.

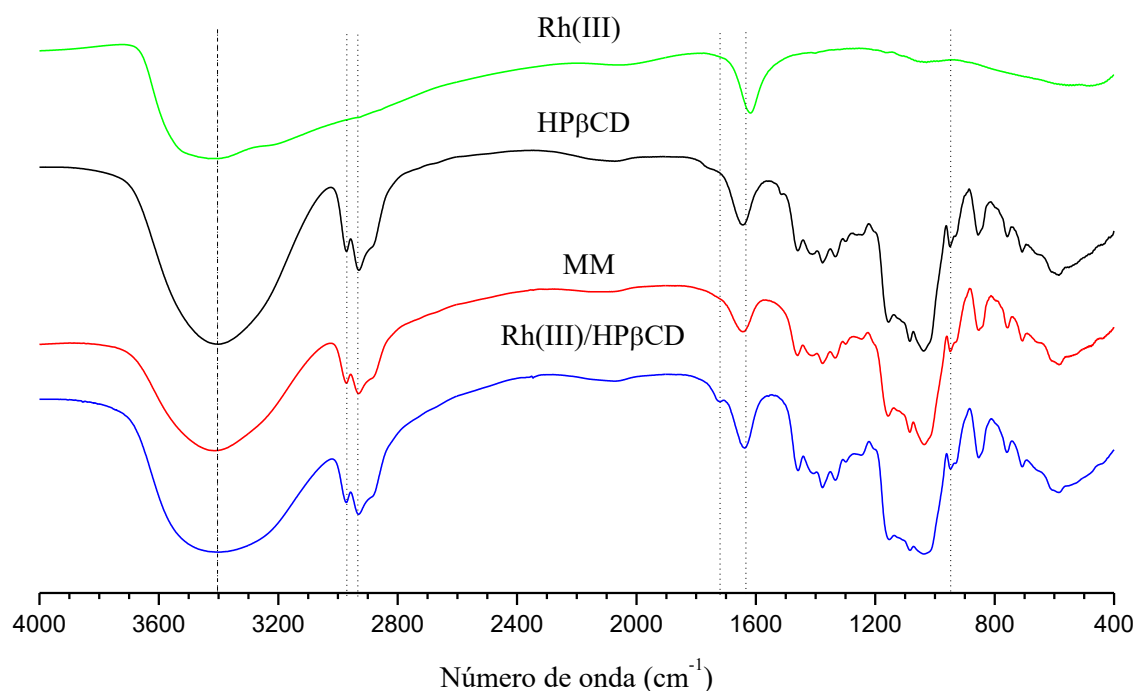
Tabela 1- Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho do Rh (III), β CD, MM e Rh(III)/ β CD.

Composto	$\nu_{(O-H)} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{(C-H), \text{CH}_2 \text{ e } \text{CH}_3} / \text{cm}^{-1}$	$\delta_{O-H}, \text{ \acute{a}gua de hidrata\c{c}\~{a}\~{o}} / \text{cm}^{-1}$	Vibração do anel piranose / cm^{-1}
RhCl ₃ .6H ₂ O	---	---	1613	---
β CD	3396	2928	1635	1158; 1028
MM	3396	2920	1643	1154; -
Rh(III)/ β CD	3411	2928	1635	1157; -

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: β CD: β -ciclodextrina, MM: mistura mecânica, Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação ródio(III)/ β -ciclodextrina; ν : número de onda.

Figura 9—Espectros de infravermelho do Rh (III), HP β CD, MM e Rh(III)/ HP β CD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh (III): ródio (III); HP β CD: hidropiril- β -ciclodextrina; MM: mistura mecânica; Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação ródio(III)/hidropiril- β -ciclodextrina; KBr: brometo de potássio.

Na Figura 9, o espectro da HP β CD está de acordo com os dados da literatura, com absorções principais em 3415 cm^{-1} , 2971 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} , que correspondem ao

estiramento OH, estiramento C-H, vibração C-O e a vibração envolvendo a ligação α -1,4, respectivamente para a HP β CD (YUAN; LIU; LIU, 2015).

Na MM ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a HP β CD isolada (Tabela 2). O perfil observado sugere que mesmo no estado sólido é possível que ocorra interação entre as moléculas. Na Tabela 2 é possível comparar algumas das principais bandas da HP β CD, MM e Rh(III)/HP β CD.

Tabela 2—Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de HP β CD, MM e Rh(III)/HP β CD.

Composto	$\nu(\text{O-H})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C-H}), \text{CH}_2$ e CH_3 cm^{-1}	$\delta_{\text{O-H}}$, água de hidratação cm^{-1}	Vibração do anel piranose cm^{-1}
RhCl ₃ .6H ₂ O	---	---	1613	---
HP β CD	3415	2971	1647	1155; 1028
MM	3417	2976	1642	1154; -
Rh(III)/HP β CD	3418	2975	1644	1155; -

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, MM: mistura mecânica, Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação ródio(III)/hidroxipropil- β -ciclodextrina; ν : número de onda.

Para o complexo Rh(III)/HP β CD é possível observar modificações nas bandas, tais como redução da intensidade de absorção e deslocamentos das bandas em 3415 cm^{-1} , 2971 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} e 1155 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento da OH, estiramento C-H, e vibração C-O respectivamente, e aparecimento de uma nova banda em 1727 cm^{-1} , sugerindo a coordenação do Rh (III) a HP β CD.

Comparando os espectros dos complexos de coordenação é possível observar que ocorreram mudanças mais significativas para o sistema com HP β CD. Estas alterações provavelmente se originaram em decorrência de uma maior afinidade entre o Rh (III) e a HP β CD em decorrência da existência dos grupamentos hidroxipropil, que por serem maiores, favorecem uma maior flexibilidade para acomodação na esfera de coordenação do centro metálico. Esse dado corrobora o resultado obtido pelo experimento de ITC que mostrou, para este sistema, uma maior constante de associação entre as moléculas.

5.1.2 Análise Termogravimétrica e Termogravimetria derivada (TGA/DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

Através da análise termogravimétrica e da análise térmica diferencial podemos avaliar a estabilidade térmica dos complexos de coordenação e compará-los com seus precursores. Este tipo de análise é importante visto que a complexação pode provocar modificações nas propriedades térmicas dos precursores, como alterações nas temperaturas de fusão e decomposição. Essas modificações levam a uma alteração do comportamento térmico dos complexos quando comparado com os componentes que o formaram (VILLAVERDE et al., 2004; YAO et al., 2014), podendo ser utilizado para avaliar a formação de ligações/interações químicas.

A análise termogravimétrica (TGA) é um método que se baseia na medida da alteração da massa em função da temperatura ou do tempo. Junto das curvas de TGA, é comum o emprego da sua derivada (curva DTG), que permite visualizar melhor a temperatura em que ocorre determinada variação de massa da amostra (YAO et al., 2014). Já a análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que monitora o fluxo de calor da amostra e da referência (material termicamente inerte) à medida que ambas vão sendo aquecidas. O fluxo de calor medido na DTA é resultado da diferença entre a temperatura da referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo, e permite determinar a natureza dos eventos (endotérmicos/exotérmicos) (YAO et al., 2014).

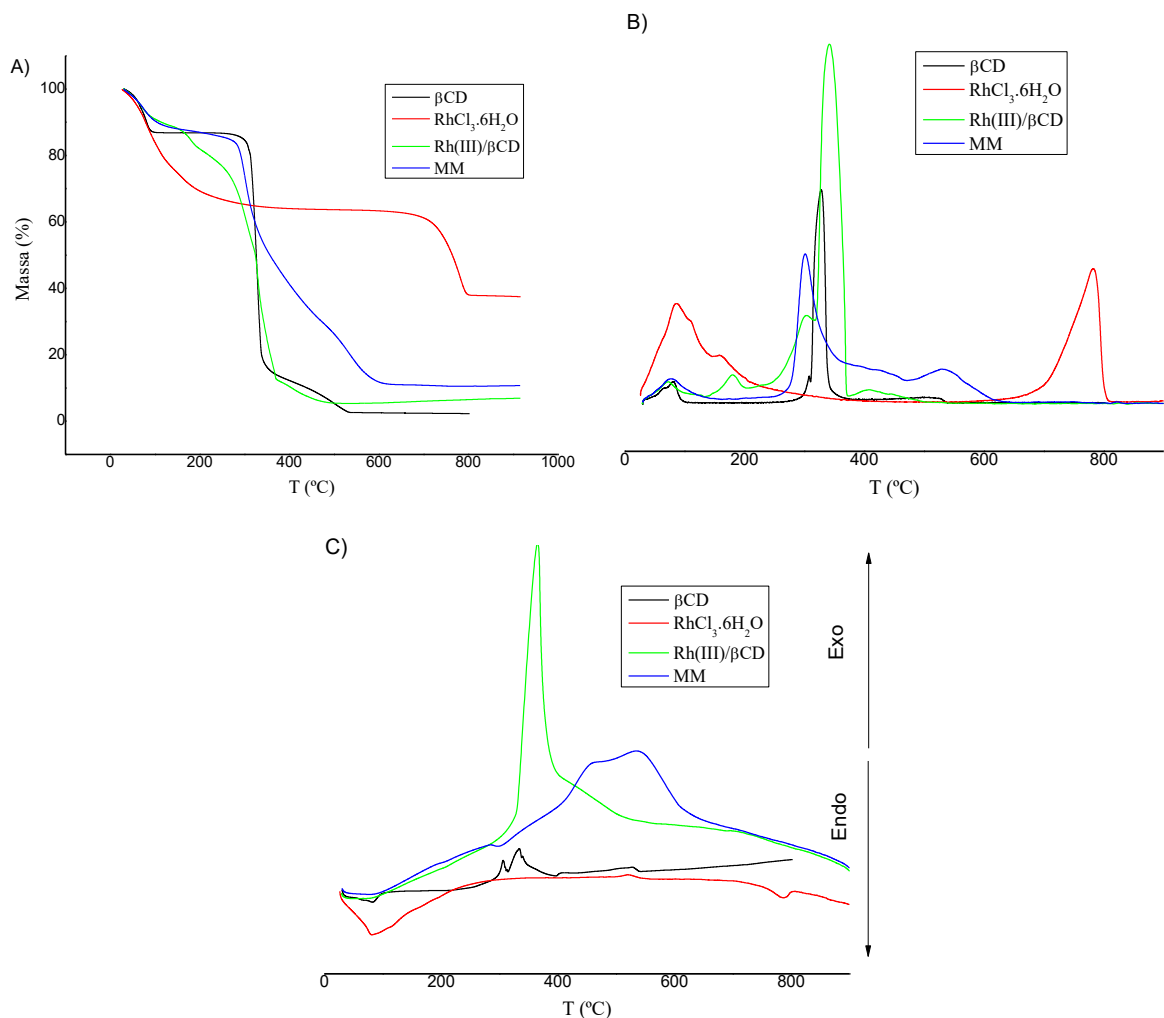
Na Figura 10 estão apresentadas as curvas de TGA/DTG e DTA da β CD, do Rh (III), do Rh(III)/ β CD e da MM.

Na curva TGA/DTG da β CD (Figura 10A e 10B) observa-se uma perda de 14,9 % de massa no intervalo de 30-99 °C atribuída ao processo de desidratação. Esse evento é seguido por um período de estabilidade térmica até 276 °C, temperatura onde inicia a fusão, seguida de decomposição a 340 °C e comprometimento de aproximadamente 82 % da massa (LANNA, 2015). Na faixa de 341 °C a 534 °C ocorrem sucessivos eventos de decomposição, após esta temperatura até 800 °C é possível observar uma estabilização com um resíduo de 3,2 % da massa da amostra inicial de β CD. Na curva DTA (Figura 10C) da β CD, observa-se um primeiro evento endotérmico com temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$) a 95 °C, atribuído à desidratação. Um segundo pico endotérmico entre 250 e 380 °C ($T_{\text{máx}} \approx 340$ °C), atribuído à decomposição e fusão da β CD (LANNA, 2015).

Nas curvas TGA/DTG do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi observado um evento de perda de 36 % da massa no intervalo de 32 °C a 317 °C, seguido de estabilidade térmica até aproximadamente

650 °C onde é observado outro evento de perda de massa, que compromete mais 30 % da massa, atribuído à decomposição do RhCl_3 em Rh (III) metálico. Após este evento é observado um período de estabilização com um resíduo de 38 % de massa (YILMAZ; SULU; YAZICILAR, 2001). Na curva de DTA do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, foi observado um primeiro evento endotérmico entre 30 °C a 217 °C com $T_{\text{máx}}$ de 89 °C, atribuído a desidratação do composto. Em seguida, outro evento endotérmico é observado entre 700 e 810 °C, com temperatura máxima de 782 °C, atribuído ao início da decomposição das moléculas de cloro, formando Rh (III) metálico.

Figura 10 —Curvas de TGA (A); DTG (B) e DTA (C) da βCD , RhCl_3 , $\text{Rh(III)}/\beta\text{CD}$ e MM.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: DTA: análise térmica diferencial; DTG: derivada da análise termogravimétrica; βCD : beta ciclodextrina; $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: cloreto de ródio (III) hexahidratado; $\text{Rh(III)}/\beta\text{CD}$: complexo de coordenação do Rh (III) com βCD ; MM: mistura mecânica; exo: exotérmico; endo: endotérmico; °C: grau Celsius.

Na curva TGA/DTG do complexo Rh(III)/ β CD observa-se que existem moléculas de água residuais, já que foi observado eventos de desidratação na faixa de temperatura 30-94 °C com perda de 10 % de massa do complexo. Em seguida são observados sucessivos eventos de fusão, seguido de decomposição na faixa de 94 °C a 473 °C e comprometimento de aproximadamente 94 % da massa, após 473 °C até 800 °C é observado uma estabilização com um resíduo de 5,9 % da massa da amostra inicial do complexo de Rh(III)/ β CD. Na curva DTA (Figura 10C) do Rh(III)/ β CD, foi observado um único evento exotérmico entre 293-523 °C, com $T_{\text{máx}}$ a 363 °C, atribuído a decomposição e fusão do Rh(III)/ β CD.

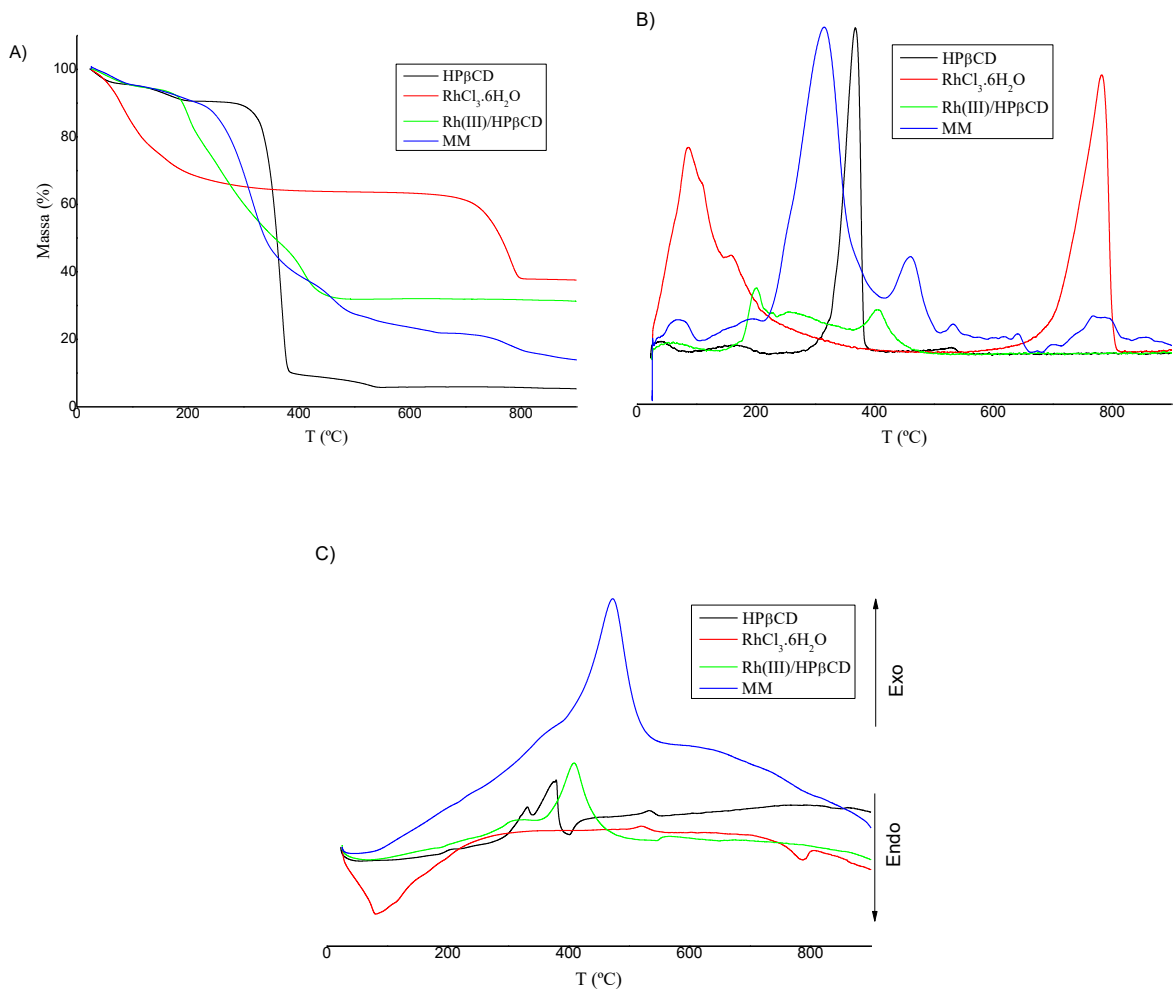
Na curva TGA/DTG da MM, observa-se uma perda de 13 % de massa no intervalo de 33-156 °C atribuído ao processo de desidratação da β CD. Na MM, os compostos são estáveis até a temperatura de 265 °C quando então iniciam-se sucessivas etapas de decomposição das moléculas. O evento de decomposição das moléculas na MM ocorreu a uma temperatura menor (próximo a 265 °C) que na molécula de $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Este evento de decomposição é observado até aproximadamente 600 °C, comprometendo 89 % da massa da MM. Após este evento até 800 °C é possível observar uma estabilização com um resíduo de 11 % de massa. Na curva DTA da MM, é possível observar um único evento exotérmico entre 305 °C a 653 °C com $T_{\text{máx}}$ de 519 °C, atribuído à decomposição e fusão da MM.

Nas curvas TGA/DTG e DTA do complexo de Rh(III)/ β CD, algumas observações importantes foram identificadas, sendo elas:

- 1) A porcentagem de massa perdida no processo de desidratação da β CD é menor no complexo comparado com a ciclodextrina pura, sugerindo que o complexo possui menos moléculas de água. Isto pode ser justificado pela coordenação do Rh (III) à β CD e expulsão das moléculas de água (KURKOV; LOFTSSON, 2013);
- 2) No complexo de coordenação, a β CD inicia sua decomposição a uma temperatura mais baixa (94 °C), em virtude das novas interações formadas;
- 3) Na curva DTA o primeiro evento endotérmico que ocorre entre 30-217 °C, atribuído à desidratação do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não foi observado no complexo e na MM;
- 4) Na curva TGA, a perda de massa, atribuída ao evento de decomposição do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que ocorreu após 650 °C não foi observado tanto na MM quanto no complexo de coordenação, mostrando um perfil térmico diferente da substância livre.

Na Figura 11 estão apresentadas as curvas de TGA, DTG e DTA da HP β CD, $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Rh(III)/HP β CD e MM.

Figura 11—Curvas de TGA (A); DTG (B) e DTA (C) da HP β CD, RhCl $_3$, Rh(III)/HP β CD e MM.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: DTA: análise térmica diferencial; DTG: derivada da análise termogravimétrica; HP β CD: hidropil beta ciclodextrina; RhCl $_3$ ·6H $_2$ O: cloreto de ródio (III) hexahidratado; Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do Rh (III) com HP β CD; MM: mistura mecânica; exo: exotérmico; endo: endotérmico; °C: grau Celsius.

Na curva TGA/DTG da HP β CD foi observado dois eventos iniciais de perda de 2,6 % e 5,8% de massa, que ocorreram em consequência da eliminação de moléculas de água de adsorção na faixa de 30-60 °C e desidratação na faixa 60-198 °C, respectivamente. Outros eventos são observados na faixa de temperatura de 263-531 °C decorrente da decomposição térmica da HP β CD, comprometendo 93 % da sua massa (VEIGA et al., 2002). Após esta temperatura até 800 °C é possível observar uma estabilização com um resíduo de 7 % da massa da amostra inicial de HP β CD. Na curva DTA observa-se um único evento exotérmico $T_{\text{máx}}$ de 449 °C, atribuído à decomposição.

Na curva de TGA/DTG do Rh(III)/HP β CD, observa-se que o complexo apresentou semelhanças com o perfil térmico observado para a HP β CD na faixa de 30-198 °C referente ao processo de perda de 8 % de massa atribuído as moléculas de água de adsorção e desidratação da HP β CD. A partir desta temperatura o complexo apresentou um perfil térmico diferente das moléculas isoladas, com um único evento de decomposição na faixa 186-466 °C comprometendo 61 % da massa do complexo. Após esta temperatura, até 800 °C, é possível observar uma estabilização com um resíduo de 31 % da massa da amostra inicial do complexo. Na curva DTA (Figura 11C) do Rh(III)/HP β CD, foi observado um evento exotérmico entre 307-382 °C, com T_{máx} a 358 °C, atribuído a decomposição e fusão do Rh(III)/HP β CD.

Na curva TGA/DTG para a MM, é possível observar uma perda de 4 % de massa, na faixa de 30-70 °C, associada à eliminação de moléculas de água de adsorção, sendo muito próxima aquela observada para a HP β CD livre. Em seguida, um novo evento na faixa de temperatura de 75-120 °C, atribuído à desidratação da molécula e comprometimento e mais 6 % da massa. A partir de 130 °C iniciou-se sucessivos eventos de decomposição da MM, até próximo de 800 °C, com comprometimento de aproximadamente 86 % da massa da MM. Na curva DTA foi possível observar um único pico exotérmico na faixa de temperatura 412 °C-516 °C atribuída ao processo de decomposição da MM.

Nas curvas TGA/DTG e DTA do complexo de Rh(III)/HP β CD, algumas observações importantes foram identificadas, sendo elas:

- 1) Tanto no complexo de coordenação quanto na MM, a HP β CD inicia sua decomposição a uma temperatura mais baixa, em virtude das novas interações formadas e possível efeito catalítico do Rh(III) sobre o ligante;
- 2) Na curva TGA/DTG, para o evento de decomposição o complexo apresentou menor faixa de temperatura que a HP β CD e a MM;
- 3) Na curva TGA, a perda de massa, atribuída ao evento de decomposição do RhCl₃.6H₂O que ocorreu após 650 °C não foi observado para o complexo de coordenação, mostrando um perfil térmico diferente da substância livre.

Destaca-se ainda que, em nenhum dos casos ocorreu sobreposição das curvas TGA/DTG e DTA das MM's e dos complexos de coordenação, indicando que existem diferenças significativas em relação às ligações estabelecidas, mostrando a formação do complexo no estado sólido, bem como a importância do contato entre as espécies na fase líquida para que as interações sejam estabelecidas. Todas as alterações observadas tanto no

experimento de IV quanto nos experimentos térmicos indicam que ocorreu a interação entre as moléculas e formação dos complexos de coordenação.

5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma poderosa técnica utilizada para a caracterização estrutural de moléculas, tanto em solução, quando no estado sólido. A técnica é baseada na absorção de energia, radiofrequências, por alguns núcleos tais como ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P , em uma molécula submetida a um campo magnético externo intenso. As transições detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados retornam ao estado fundamental geram os sinais de RMN do núcleo (ALVES, 2010).

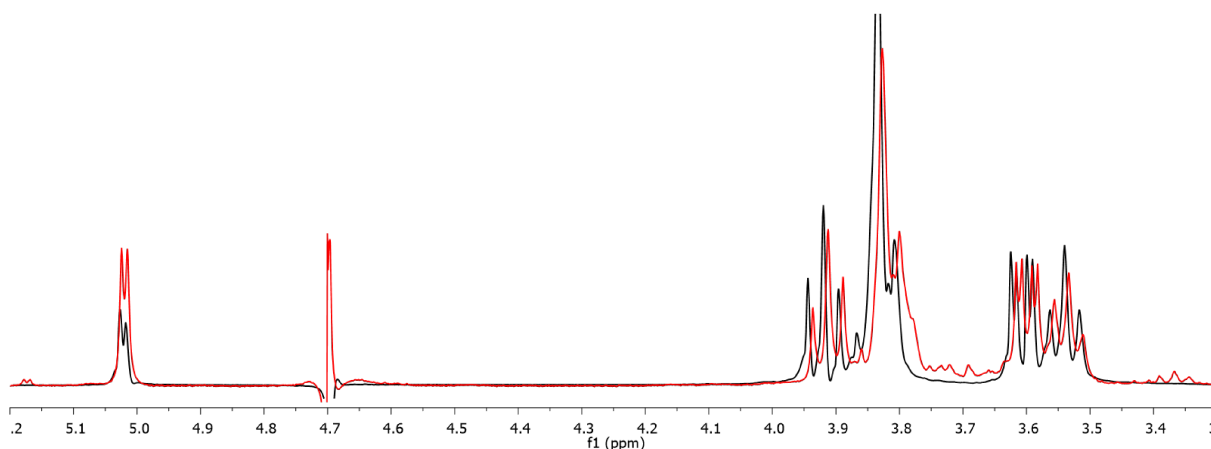
Esta técnica possibilita a caracterização de complexos fornecendo diversas informações estruturais como, por exemplo, orientação molecular das substâncias (ALVES, 2010). As modificações nos sinais da matriz se devem às alterações provocadas pela coordenação com o ligante, visto que o estabelecimento dessas interações leva a mudanças na distribuição eletrônica sobre os núcleos dos átomos envolvidos e, conseqüentemente altera o momento magnético nuclear resultante. Isso é refletido no espectro de RMN como uma variação no deslocamento químico, alteração no perfil do sinal ou nas suas intensidades (ALVES, 2010; VENTURINI et al., 2008).

Na Figura 12 está representada a sobreposição dos espectros de RMN de ^1H de βCD (em preto) e $\text{Rh(III)}/\beta\text{CD}$ (em vermelho). Na Tabela 3 estão descritos os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios da βCD livre.

Não foi possível realizar o espectro do Rh(III) uma vez que não existe nenhum hidrogênio ligado diretamente ao composto. E baseado nisso, as interações entre o Rh(III) e as CDs foram monitoradas através dos sinais de hidrogênios das CDs.

No espectro de RMN de ^1H de βCD obtido em D_2O a 400 MHz foi possível observar todos os sinais referentes aos hidrogênios da βCD e os dados estão de acordo com a literatura (MORAIS, 2016; SOUSA, 2007). Nele pode-se observar sinais referentes aos hidrogênios 1-6 do monômero glicopiranosídico. As atribuições e os valores dos deslocamentos químicos dos sinais da βCD e $\text{Rh(III)}/\beta\text{CD}$, bem como a variação de deslocamento químico quando comparado os dois espectros estão relacionados na Tabela 3.

Figura 12—Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da βCD (preto) e $\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$ (vermelho) em D_2O , 400 MHz.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; βCD : β -ciclodextrina; $\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$: complexo de coordenação ródio(III)/ β -ciclodextrina; D_2O : Óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

Tabela 3— Deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênios (^1H) da βCD e $\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$ (D_2O , 400 MHz).

Atribuições	βCD (ppm)	COMPLEXO	
		$\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$ (ppm)	$\Delta\delta$
1 -CH	5,017	5,015	0,002
2 -CH	3,594	3,591	0,003
3 -CH	3,918	3,912	0,006
4 -CH	3,558	3,556	0,002
5 -CH	3,829	3,827	0,002
6 -CH ₂	3,805	3,800	0,005

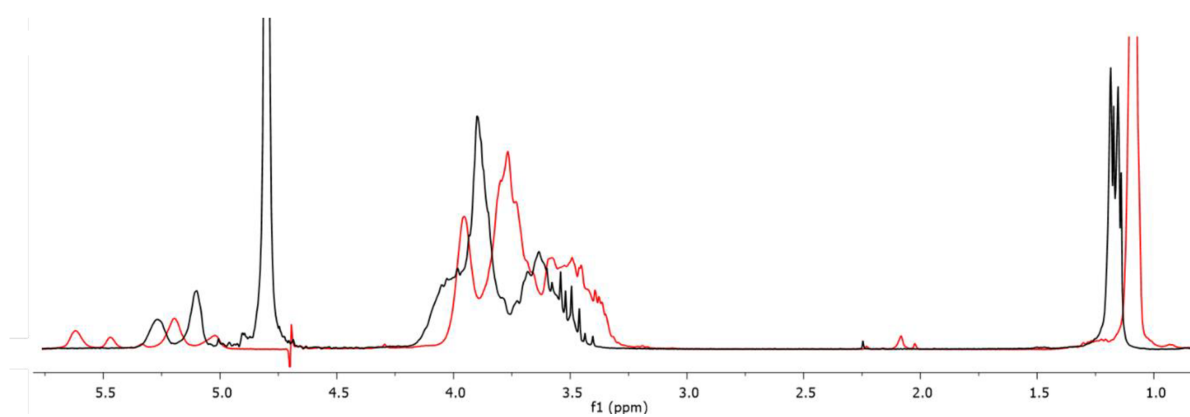
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: βCD : β -ciclodextrina; $\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$: complexo de coordenação ródio(III)/ β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da βCD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

Comparando o espectro de RMN de ^1H da βCD com o espectro do complexo de $\text{Rh(III)/}\beta\text{CD}$ é possível observar que ocorreu mudanças significativas para todos os sinais de ^1H analisados. Com destaque para os H3 e H6, que sofreram maiores variações nos deslocamentos químicos, sugerindo que tenham sido mais perturbados durante o processo de complexação.

De maneira similar, a Figura 13 representa a sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da HP β CD (em preto) e Rh(III)/HP β CD (em vermelho) em D_2O , 400 MHz. As atribuições e os valores dos deslocamentos do espectro de RMN de ^1H da HP β CD estão de acordo com os dados da literatura (WANG et al., 2014), e podem ser observados na Tabela 4. O espectro de RMN de ^1H da HP β CD é mais complexo quando comparado ao da β CD, uma vez que a HP β CD é obtida através da inserção de grupamentos hidroxipropila na estrutura da β CD.

Figura 13—Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da HP β CD (preto) e Rh(III)/HP β CD (vermelho) em D_2O , 400 MHz.



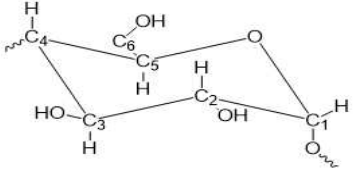
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação ródio(III)/hidroxipropil- β -ciclodextrina; D_2O : óxido de deuterado; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

As atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos hidrogênios da HP β CD e Rh(III)/HP β CD, bem como as variações de deslocamentos de sinais de ^1H entre os dois espectros encontram-se apresentados na Tabela 4.

Analisando o espectro de RMN de ^1H da HP β CD e do complexo de Rh(III)/HP β CD é possível observar que todos os sinais de ^1H sofrem variações nos deslocamentos químicos. Vale ressaltar que os H1 e H4, que sofreram maiores variações nos deslocamentos químicos, foram mais perturbados durante o processo de complexação, sugerindo que a interação entre o Rh (III) e a HP β CD possa ter sido estabelecida nesta posição.

Tabela 4— Deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênios (^1H) da HP β CD e Rh(III)/HP β CD (D_2O , 400 MHz).

	Atribuições		HP β CD (ppm)	COMPLEXO	
				Rh(III)/HP β CD (ppm)	$\Delta\delta$
	1	-CH	5,11	5,21	0,10
	2	-CH	3,64	3,69	0,05
	3	-CH	3,79	3,85	0,06
	4	-CH	3,87	3,98	0,11
	5	-CH	3,73	3,76	0,03
	6	-CH ₂	3,61	3,57	0,04

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação ródio(III)/hidroxipropil- β -ciclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da HP β CD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão.

As nítidas alterações nos deslocamentos químicos dos sinais de ^1H da β CD e HP β CD sugerem que a complexação do Rh (III) com as ciclodextrinas causem modificações eletromagnéticas no ambiente químico após coordenação. Comparando as mudanças nos deslocamentos químicos dos espectros dos complexos de coordenação, observa-se que para o sistema com HP β CD houve maiores variações deste parâmetro. Essa mudança corrobora o maior valor da constante de associação encontrada pelo experimento de ITC, citado na próxima sessão, para o complexo de Rh(III)/HP β CD.

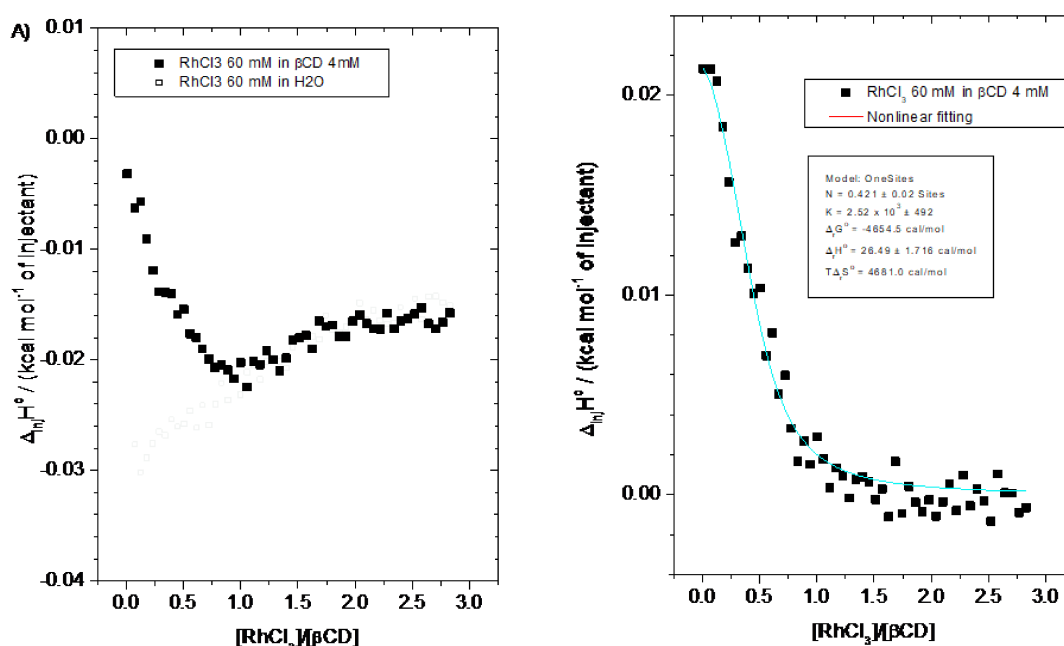
5.1.4 Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)

A técnica de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) fundamenta-se na mensuração do calor liberado ou absorvido durante a formação de interações moleculares e tem sido amplamente utilizada na determinação de vários processos moleculares em solução. É uma técnica potencialmente relevante na caracterização de complexos de inclusão por permitir a determinação direta da estequiometria de complexação (N), da constante de associação (K_{eq}) e da variação de entalpia ($\Delta_r H^\circ$). Além disso, os parâmetros entropia ($T\Delta_{int} S^\circ$) e energia livre de Gibbs ($\Delta_{int} G^\circ$) do processo, que podem ser obtidos através da utilização de equações termodinâmicas e dos dados apresentados pelo ITC, servem para descrição do mecanismo de interação (SELVA et al., 2010).

Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de titulação do RhCl_3 em β CD. Inicialmente foram realizadas as titulações do composto em água e, após a subtração dessa curva de diluição

(branco), obteve-se a curva final de titulação. Esse procedimento teve como objetivo excluir os efeitos de interação soluto-soluto, soluto-solvente e solvente-solvente, a fim de avaliar apenas as interações soluto-ciclodextrina (PASSOS et al., 2013). Na Tabela 5 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação entre o RhCl_3 e βCD obtidos no experimento.

Figura 14— Titulação calorimétrica isotérmica do RhCl_3 (60 mM em água) em solução de βCD (4mM em água) a 25 °C.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: ITC: Titulação Calorimétrica isotérmica; βCD : β -ciclodextrina; RhCl_3 : Cloreto de ródio (III); N: estequiometria; K: constante de associação; $\Delta_r\text{H}^\circ$: variação da entalpia; $T\Delta_r\text{S}^\circ$: variação da entropia; $\Delta_r\text{G}^\circ$: energia livre de Gibbs.

Tabela 5— Parâmetros termodinâmicos de interação entre o RhCl_3 e βCD , a 25°C.

Complexo	N	K	$\Delta_r\text{G}^\circ$ (cal.mol ⁻¹)	$\Delta_r\text{H}^\circ$ (cal.mol ⁻¹)	$T\Delta_r\text{S}^\circ$ (cal.mol ⁻¹)
Rh(III)/ βCD	0,42 ± 0,02	2,52 x10 ³ ± 492	- 4654.5	26,49 ± 1.72	4681.0

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

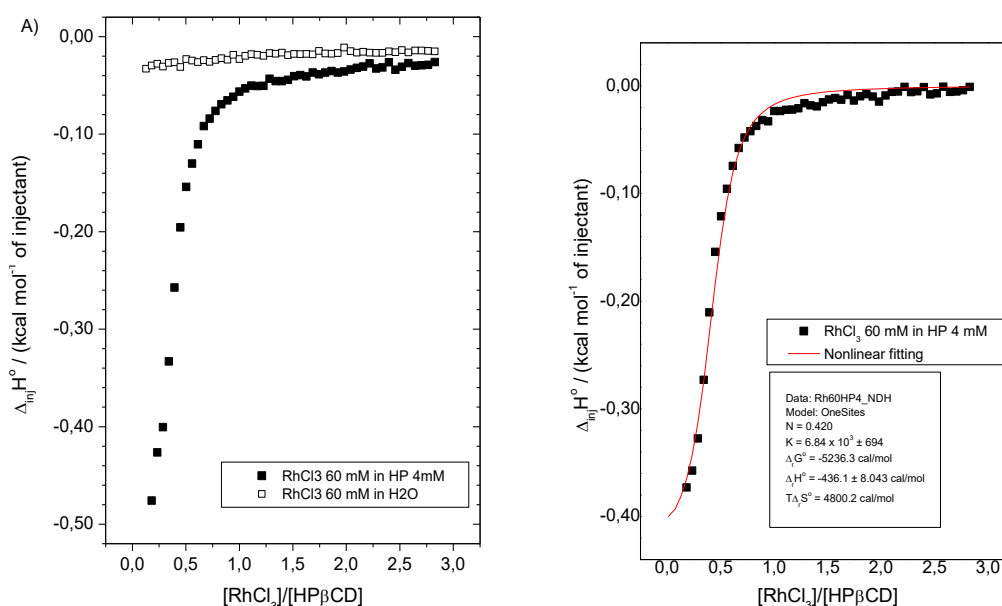
Legenda: Rh(III)/ βCD : complexo de coordenação ródio(III)/ β -ciclodextrina; N: estequiometria; K: constante de associação; $\Delta_r\text{G}^\circ$: energia livre de Gibbs; $\Delta_r\text{H}^\circ$: variação da entalpia; $T\Delta_r\text{S}^\circ$: variação da entropia.

Para a titulação do RhCl_3 em βCD foi possível observar uma estequiometria do complexo de 1:2, uma vez que o “N” encontrado foi de $0,42 \pm 0,02$. Baseado nos dados

termodinâmicos, pôde-se observar que a complexação é um processo endotérmico ($\Delta_r H^\circ > 0$), favorecido por entropia. Um processo endotérmico indica quebra de interações intermoleculares/ligações químicas específicas, bem como de estruturas de solvatação, com subsequente formação de interações menos estáveis do que as existentes antes da complexação (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015). O processo foi, portanto, direcionado por entropia, que por sua vez foi atribuída à dessolvatação das espécies durante a complexação.

Na Figura 15 está representada a curva final de titulação do RhCl_3 em HP β CD. Para essa interação a estequiometria encontrada também foi de 1:2 (“N”: 0,420) e ocorreu espontaneamente nas condições do experimento (ver Tabela 6). Porém, diferente do observado para a β CD, o processo apresentou componente entálpica favorável, além de ter sido também direcionado por entropia (valor positivo).

Figura 15— Titulação calorimétrica isotérmica do RhCl_3 (60 mM em água) em solução de HP β CD (4 mM em água) a 25°C.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: ITC: Titulação Calorimétrica isotérmica; HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina; RhCl_3 : cloreto de ródio (III); N: estequiometria; K: constante de associação; $\Delta_r H^\circ$: variação da entalpia; $T\Delta_r S^\circ$: variação da entropia; $\Delta_r G^\circ$: energia livre de Gibbs.

Processo exotérmico (entalpia negativa) sugere que a formação de interações/ ligações específicas, o que resulta em fluxo de calor do sistema para as vizinhanças. Esse valor originou-

se, muito provavelmente, da formação de ligações covalentes entre o centro metálico Rh (III) com os oxigênios dos grupos hidroxipropil da HP β CD.

Tabela 6— Parâmetros termodinâmicos de interação entre RhCl₃ e HP β CD (T= 25 °C).

Complexo	N	K	$\Delta_r G^\circ$ (cal.mol ⁻¹)	$\Delta_r H^\circ$ (cal.mol ⁻¹)	$T\Delta_r S^\circ$ (cal.mol ⁻¹)
Rh(III)/HP β CD	0,420	$6,84 \times 10^3 \pm 694$	- 5236.3	- 436.1 \pm 8.0	4800.2

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação ródio(III)/hidroxipropil- β -ciclodextrina; N: estequiometria; K: constante de associação; $\Delta_r G^\circ$: energia livre de Gibbs; $\Delta_r H^\circ$: variação da entalpia; $T\Delta_r S^\circ$: variação da entropia.

Ambos os compostos apresentaram constantes de afinidade moderadas ($\approx 10^3$) quando comparado a outros compostos de inclusão da literatura (SILVA, 2015), dentro da faixa ideal para usos como dispositivos de liberação. Contudo, a diferença nos valores de K, bem como no perfil endotérmico/exotérmico pode ser atribuído à presença dos grupos hidroxipropil na HP β CD, os quais são mais flexíveis para interação com o ródio (III), facilitando a ligação Rh (III)-CD. Além disso, a interação direta do Rh (III) com a β CD pode causar pequenas distorções conformacionais no esqueleto da ciclodextrinas, explicando seu perfil endotérmico frente à interação do Rh (III) com a HP β CD.

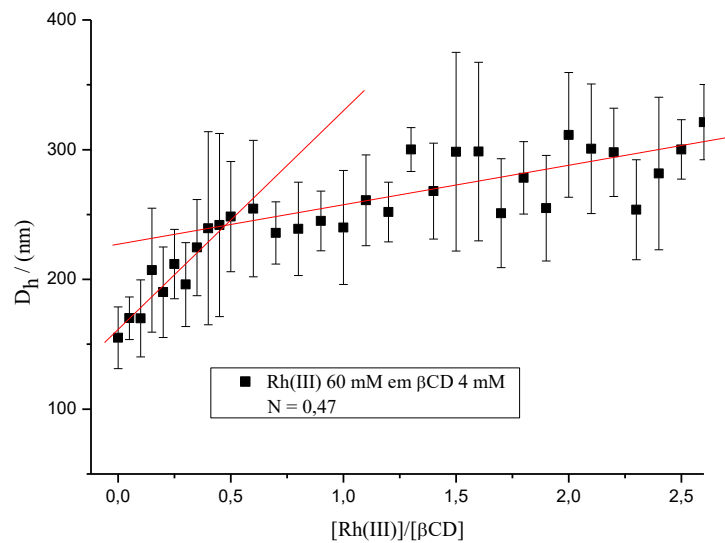
5.1.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma ferramenta amplamente utilizada na determinação do tamanho médio de nanoestruturas em suspensão. Este método baseia-se na dispersão do feixe de luz, laser monocromático, quando a partícula é iluminada pelo mesmo considerando o movimento Browniano das partículas e o fato que pequenas partículas se deslocam mais rapidamente que partículas maiores. O diâmetro hidrodinâmico (D_h) da partícula em suspensão é o parâmetro físico-químico obtido por esse experimento (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, a variação da intensidade da luz espalhada é maior, pois como se movimentam mais rapidamente, essas partículas cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um determinado intervalo de tempo (HASSAN; RANA; VERMA, 2015).

A titulação da solução aquosa de Rh (III) a 60 mM em uma solução aquosa de ciclodextrina (β CD e HP β CD) a 4 mM, foi realizada para obter a distribuição do tamanho das

partículas. Na Figura 16 é apresentado o gráfico de D_h dos agregados de partículas formadas em solução aquosa, em função da razão molar $[Rh(III)]/[\beta CD]$; enquanto que na Figura 17, o correspondente gráfico para o sistema com $[Rh(III)]/[HP\beta CD]$.

Figura 16—Distribuição do tamanho dos agregados de partículas formados em solução aquosa, em função da proporção da $[Rh(III)]/[\beta CD]$.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

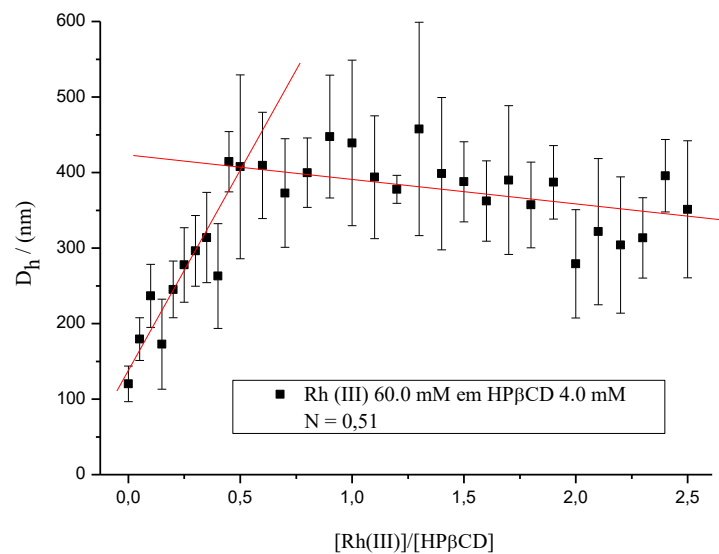
Legenda: D_h : diâmetro hidrodinâmico; nm: nanômetros; Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; βCD : beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; $[Rh(III)]/[\beta CD]$: concentração do ródio (III) dividido pela concentração da beta-ciclodextrina.

Como pode ser observado nas Figuras 16 e 17, logo no início da titulação observa-se valores de tamanho da ordem de 100 a 150 nm. Isso mostra que nas soluções de ciclodextrinas, ocorre formação espontânea de agregados de ciclodextrinas, conforme relatos da literatura (JANSOOK; MOYA-ORTEGA; LOFTSSON, 2010; MESSNER et al., 2010). Observa-se também que com a adição de Rh (III) no meio, ocorrem alterações no tamanho desses agregados, mostrando que a presença de Rh (III) acentua o processo de agregação. Os dados mostram que os complexos de coordenação formados pela interação das ciclodextrinas com o Rh (III) também estão sujeitos a um segundo nível de agregação, formando estruturas terciárias e elevado número de agregação.

As Figuras 16 e 17, também mostram nítidas variações no diâmetro hidrodinâmico das estruturas, em pelo menos duas regiões de comportamento distinto. O ponto de interseção das curvas de regressão linear para o sistema $[Rh(III)]/[\beta CD]$ e $[Rh(III)]/[HP\beta CD]$ foi na razão

molar de 0,47 mM e 0,51 mM, respectivamente. Este resultado vai de encontro com os dados de estequiometria de associação obtidos no experimento de ITC, onde o ponto de divisão foi observado em 0,42 mM, para os dois sistemas, na mesma ordem de magnitude.

Figura 17—Distribuição do tamanho dos agregados de partículas formados em solução aquosa, em função da proporção da $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: D_h : diâmetro hidrodinâmico; nm: nanômetros; Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; HP β CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

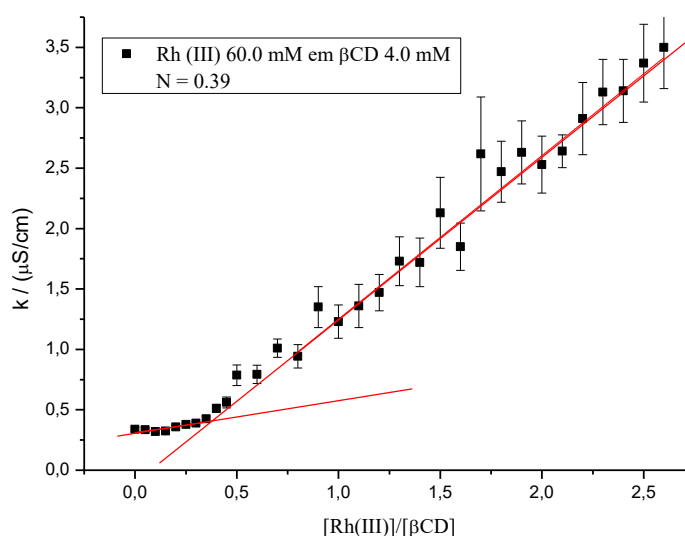
Na primeira região, até próximo de $N \approx 0,5$, podemos observar que o aumento da concentração de Rh (III) leva a um aumento nos valores de D_h para as CDs (β CD e HP β CD), devido à formação de complexos de coordenação, que por sua vez, se ligam entre si formando estruturas supramoleculares terciárias (agregados de complexos de coordenação). Entretanto, após este valor de razão molar, observa-se que os valores de tamanho tendem a permanecer constantes. Após $N \approx 0,5$, o Rh (III) não se liga aos agregados de ciclodextrinas e o D_h das partículas não sofre grandes alterações e o excesso de ródio não causa alteração expressiva no tamanho dos agregados.

5.1.6 Condutimetria

O parâmetro condutividade elétrica também foi determinado, por meio do experimento de Potencial Zeta (PZ) descrito na próxima seção (5.1.7).

Na Figura 18 está apresentado o gráfico de condutividade do Rh (III) em função do aumento da razão molar $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$; enquanto que na Figura 19, o correspondente gráfico para o sistema $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$.

Figura 18— Titulação condutimétrica de Rh (III) 60 mM em βCD 4 mM.

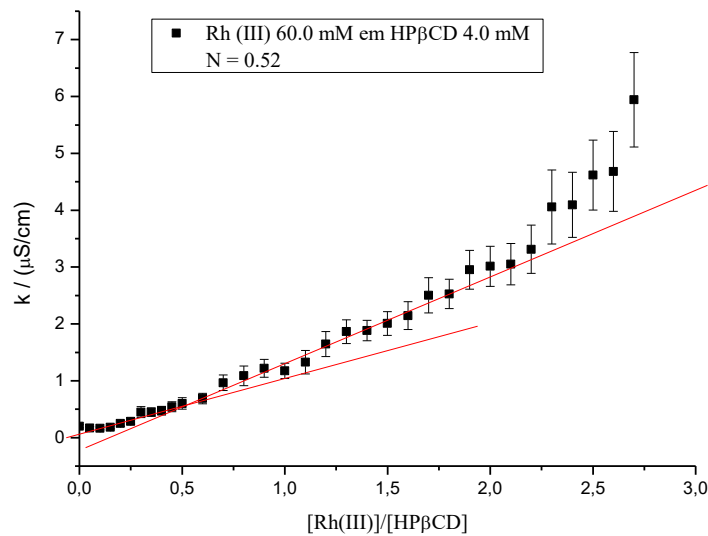


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; βCD : beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de beta-ciclodextrina.

As Figuras 18 e 19 mostram os valores de condutividade elétrica medidos durante a titulação de solução de RhCl_3 60 mM em soluções a 4 mM de βCD e $\text{HP}\beta\text{CD}$ respectivamente. Nas Figuras, pode-se observar duas regiões distintas delimitadas pela interseção das curvas de regressão linear. O ponto de interseção das curvas de regressão linear para o sistema $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$ e $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$ apresentou valores de razão molar de 0,39 mM e 0,52 mM, respectivamente. Esses valores de razão molar encontrados corroboram os valores encontrados para o experimento de ITC e D_h , reafirmando a formação dos complexos de coordenação e a estequiometria de complexação de 1:2.

Figura 19— Titulação condutimétrica de Rh (III) 60 mM em HP β CD 4 mM.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; HP β CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; [Rh(III)]/[HP β CD]: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

Inicialmente, na primeira região, o aumento da concentração do Rh (III) não interfere significativamente na condutividade elétrica dos sistemas, uma vez que o todo o Rh (III) adicionado está envolvido na complexação e formação de agregados de complexos de coordenação que devem apresentar menores valores de condutividade molar devido aos maiores tamanhos. Nestes agregados, o Rh (III) está ligado ao complexo apresentando pouca mobilidade e, portanto, contribui menos para o valor de condutividade elétrica medido.

Contudo, na segunda região, a partir do ponto de interseção das curvas de regressão linear ($N \approx 0,5$), momento que aconteceu a saturação dos agregados de ciclodextrinas, o Rh (III) adicionado apresenta-se livre e, conseqüentemente, contribuindo mais efetivamente com a condutividade elétrica total em ambos os sistemas.

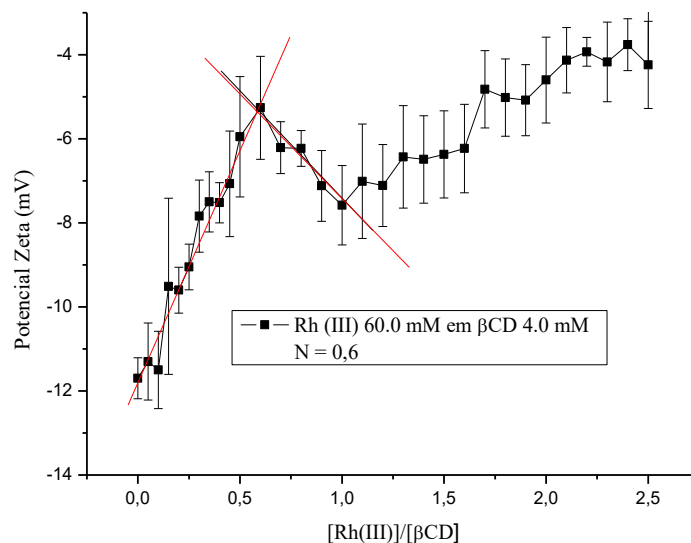
5.1.7 Potencial Zeta (PZ)

O Potencial Zeta (PZ) está relacionado com a carga superficial da partícula e relaciona-se diretamente com a estabilidade da dispersão. Quando um sistema apresenta valores PZ abaixo de $|30|$ mV, tem-se que as dispersões são mais instáveis. Assim, valores de PZ superiores

a $|\zeta|$ mV indicam dispersões com maior estabilidade, onde as forças eletrostáticas são superiores às forças atrativas de Van der Waals. (INSTRUTECNICA, 2016).

Nas Figuras 20 e 21 estão apresentados, respectivamente, os gráficos de PZ em função da concentração crescente de Rh (III) em β CD e HP β CD.

Figura 20—Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção da $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$.

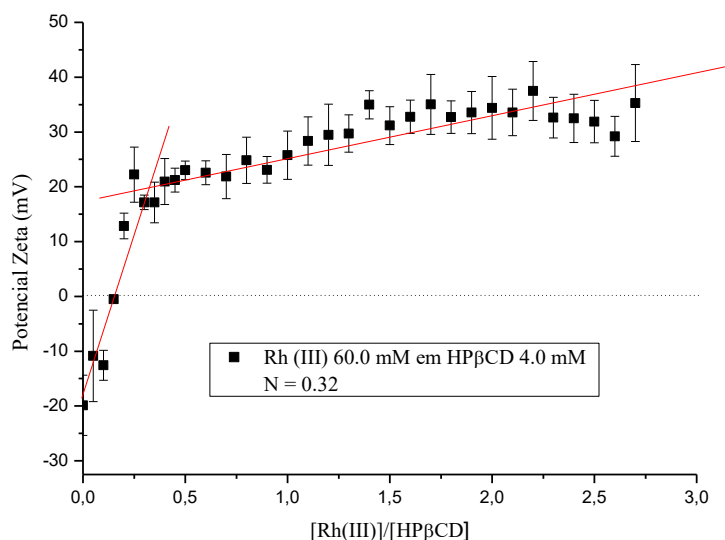


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: PZ: Potencial Zeta; Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; β CD: beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; $[\text{Rh(III)}]/[\beta\text{CD}]$: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de beta-ciclodextrina.

Com relação aos dados de PZ observa-se, que os agregados de ciclodextrinas (β CD e HP β CD) formados em solução aquosa apresentaram valores de PZ de aproximadamente -12 mV e -20 mV respectivamente, devido à ionização parcial das hidroxilas (Figura 20 e 21). Conforme já citado, o aumento da concentração do Rh (III), para os dois sistemas, induz a formação de agregados de complexos de coordenação com ciclodextrinas, até o ponto de interseção da curva de regressão linear. Porém, esta indução no fenômeno de agregação vem acompanhado de alterações na carga superficial dos agregados.

Figura 21- Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção da $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: PZ: Potencial Zeta; Rh (III): ródio (III); mM: milimolar; $\text{HP}\beta\text{CD}$: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; N: estequiometria de associação; $[\text{Rh(III)}]/[\text{HP}\beta\text{CD}]$: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

Como o ródio pode apresentar-se em solução até na forma de Rh^{3+} , é de se esperar uma neutralização, pelo menos parcial das ciclodextrinas. Essa ligação explica o aumento dos valores de PZ de -12 mV a -5 mV para o sistema com βCD e de -20 mV a + 20 mV para o sistema com $\text{HP}\beta\text{CD}$.

Ao final da titulação, os valores de PZ para os agregados de complexos de coordenação para o sistema com a βCD foram dentro da faixa de -12 mV a -3 mV, e para o sistema com a $\text{HP}\beta\text{CD}$ foi dentro da faixa de -20 mV a + 35 mV. Os dois sistemas encontram-se dentro da faixa de instabilidade, contudo os valores de PZ mais elevados para os agregados de complexos de coordenação indicam que estes são mais estáveis que os agregados de ciclodextrinas puras.

O ponto de interseção das curvas de regressão linear, no momento da saturação dos agregados de ciclodextrinas pelo Rh (III), mostrou valores de concentração de agregação igual a 0,60 mM para o sistema com βCD e 0,32 mM para o sistema da $\text{HP}\beta\text{CD}$. Os valores de N encontrados para o PZ em função da proporção da concentração do Rh(III)/CD, para ambos os sistemas, foram na mesma ordem de magnitude encontrados tanto no experimento de ITC como no D_h e no experimento de condutimetria, confirmando a estequiometria de formação dos complexos de coordenação.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de coordenação na viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1

O ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT é um teste que verifica a viabilidade celular após a exposição às substâncias em estudo, sendo um dos métodos colorimétricos mais amplamente utilizados devido ao baixo custo e rapidez no processamento das amostras (DE ARAUJO et al., 2008). Nas Tabela 7 e 8 são apresentados os resultados de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1, respectivamente, após 3 horas de tratamento com o Rh (III) e com complexos de coordenação com ciclodextrinas, nas concentrações de 50 μM , 100 μM e 300 μM .

Tabela 7—Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ βCD , Rh(III)/HP βCD , Rh (III), βCD e HP βCD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos RAW 264.7 em 3 horas de cultura.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μM ^b	100 μM ^b	300 μM ^b
Rh(III)/ βCD	100,20 \pm 1,61	92,44 \pm 2,32	101,30 \pm 0,43
Rh(III)/HP βCD	93,43 \pm 0,53	91,38 \pm 2,31	93,16 \pm 2,32
Rh(III)	81,98 \pm 1,30	94,49 \pm 4,12	95,25 \pm 1,44
βCD	97,52 \pm 6,16	82,89 \pm 1,67	89,38 \pm 1,15
HP βCD	92,68 \pm 3,73	95,66 \pm 3,86	92,39 \pm 6,31

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: (a) tratamento com complexo de coordenação de ródio (III) com β -ciclodextrina (Rh(III)/ βCD), complexo de coordenação de ródio (III) com hidroxipropil/ β -ciclodextrina (Rh(III)/HP βCD), ródio (III) puro (Rh(III)), β -ciclodextrina (βCD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP βCD); (b) concentração das substâncias (μM).

Conforme a Tabela 7, é possível observar que o Rh (III), nas concentrações testadas, manteve a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 a valores superiores a 80 % após três horas de tratamento. Além do Rh (III), os complexos Rh(III)/ βCD e Rh(III)/HP βCD também mantiveram a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7. O tratamento das células com os complexos mostrou viabilidade superior a 90 % após 3 horas de cultura.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, foi possível observar que o Rh (III), nas concentrações testadas em 3 horas de tratamento, manteve a viabilidade celular de J774A.1 a valores superiores que 85 %. Este efeito também foi observado para os complexos. Tanto o complexo de Rh(III)/ β CD, quanto Rh(III)HP β CD mantiveram a viabilidade celular e após 3 horas de tratamento foi possível observar que a viabilidade celular de J774A.1 foi em média maior que 75 % para ambos os complexos. Segundo a ISO 10993-5 (2009), em ensaios de MTT, os compostos que não reduzem a viabilidade celular a valores inferiores a 70%, são considerados não citotóxicos.

Tabela 8—Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh (III), com β CD, HP β CD a 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em macrófagos J774A.1 em 3 horas de cultura.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M ^b	100 μ M ^b	300 μ M ^b
Rh(III)/ β CD	83,33 \pm 0,37	93,23 \pm 0,49	84,35 \pm 3,48
Rh(III)/HP β CD	94,99 \pm 6,42	79,03 \pm 2,54	77,98 \pm 5,01
Rh(III)	91,94 \pm 3,45	86,26 \pm 0,98	92,54 \pm 7,87
β CD	99,45 \pm 2,21	82,26 \pm 7,73	86,50 \pm 1,89
HP β CD	90,69 \pm 4,68	97,15 \pm 4,49	94,07 \pm 2,66

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: (a) tratamento com complexo de coordenação de ródio (III) com β -ciclodextrina (Rh(III)/ β CD), complexo de coordenação de ródio (III) com hidroxipropil/ β -ciclodextrina (Rh(III)/HP β CD), ródio (III) puro (Rh(III)), β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD); (b) concentração das substâncias (μ M).

Assim, conforme mostra as Tabelas 7 e 8, observa-se que o tratamento com Rh (III) e com os complexos de Rh (III) com ciclodextrinas não promoveram efeito citotóxico nas concentrações testadas após 3 horas de cultura de macrófagos, prosseguindo com a avaliação da expressão do fator de transcrição NF- κ B.

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os resultados de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1, respectivamente, após 48 horas de cultura, na presença do Rh (III) e os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M.

Através dos resultados obtidos nas Tabelas 9 e 10, foi possível observar que o Rh (III) manteve a viabilidade celular dos dois macrófagos, após o período de tratamento. A viabilidade

celular para o macrófago RAW 264.7 foi superior a 90 % nos tratamentos com concentrações de 50 μM e 100 μM e superior a 80 % na maior concentração testada, 300 μM ; enquanto que para o J774A.1, Tabela 10, nas concentrações de 50 μM e 100 μM , foi observado viabilidade celular superior a 100 %, enquanto que na concentração de 300 μM , a viabilidade foi superior a 85 %, quando comparado ao controle não tratado.

Ainda na Tabela 9, é possível observar que os complexos de Rh(III)/ βCD e Rh(III)/HP βCD também mantiveram a viabilidade de macrófagos RAW 264.7. Após 48 horas de tratamento, ambos os complexos mantiveram aproximadamente 100 % de viabilidade celular na menor concentração testada. Já na concentração de 100 μM as células apresentaram viabilidade aproximada de 90 %, e para a maior concentração foi observada viabilidade celular superior a 70 %.

Tabela 9— Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ βCD , Rh(III)/HP βCD , Rh(III), com βCD e HP βCD a 300 μM , 100 μM e 50 μM em macrófagos RAW 264.7 em 48 horas de cultura.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μM ^b	100 μM ^b	300 μM ^b
Rh(III)/ βCD	99,41 \pm 6,04	89,24 \pm 1,17	76,98 \pm 0,72
Rh(III)/HP βCD	100,00 \pm 3,38	93,33 \pm 4,81	74,94 \pm 1,42
Rh(III)	94,30 \pm 2,17	93,37 \pm 3,15	88,75 \pm 2,76
βCD	100,40 \pm 8,30	97,32 \pm 4,67	107,10 \pm 1,01
HP βCD	97,22 \pm 1,45	88,68 \pm 3,58	98,86 \pm 1,95

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: (a) tratamento com complexo de coordenação de ródio (III) com β -ciclodextrina (Rh(III)/ βCD), complexo de coordenação de ródio (III) com hidroxipropil/ β -ciclodextrina (Rh(III)/HP βCD), ródio (III) puro (Rh(III)), β -ciclodextrina (βCD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP βCD); (b) concentração das substâncias (μM).

Com os resultados apresentados na Tabela 10, é possível observar que além do Rh(III) que manteve a viabilidade celular, os complexos de Rh(III)/ βCD e Rh(III)/HP βCD também não alteraram a viabilidade celular de macrófagos J774A.1 após 48 horas de tratamento. O complexo de Rh(III)/ βCD manteve a viabilidade celular superior a 85 % nas concentrações de 50 μM e 100 μM e na concentração de 300 μM a viabilidade foi superior a 70 %. E o complexo

de Rh(III)/HP β CD, nas duas menores concentrações mostraram viabilidade celular próxima a 100 % e para o tratamento com a concentração de 300 μ M a viabilidade foi superior a 80 %.

Tabela 10— Avaliação da citotoxicidade do complexo de Rh(III)/ β CD, Rh(III)/HP β CD, Rh(III), β CD e com HP β CD a 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M em macrófagos J774A.1 em 48 horas de cultura.

Substâncias ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M ^b	100 μ M ^b	300 μ M ^b
Rh(III)/ β CD	85,01 \pm 4,30	99,91 \pm 5,41	70,27 \pm 7,29
Rh(III)/HP β CD	97,59 \pm 1,88	100,00 \pm 3,83	81,96 \pm 4,55
Rh(III)	105,70 \pm 4,74	104,80 \pm 6,12	89,08 \pm 2,84
β CD	88,95 \pm 8,04	90,99 \pm 7,33	105,50 \pm 9,64 (>100%)
HP β CD	100,00 \pm 4,85	100,00 \pm 1,24	98,30 \pm 4,00

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: (a) tratamento com complexo de coordenação de ródio (III) com β -ciclodextrina (Rh(III)/ β CD), complexo de coordenação de ródio (III) com hidroxipropil/ β -ciclodextrina (Rh(III)/HP β CD), ródio (III) puro (Rh(III)), β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD); (b) concentração das substâncias (μ M).

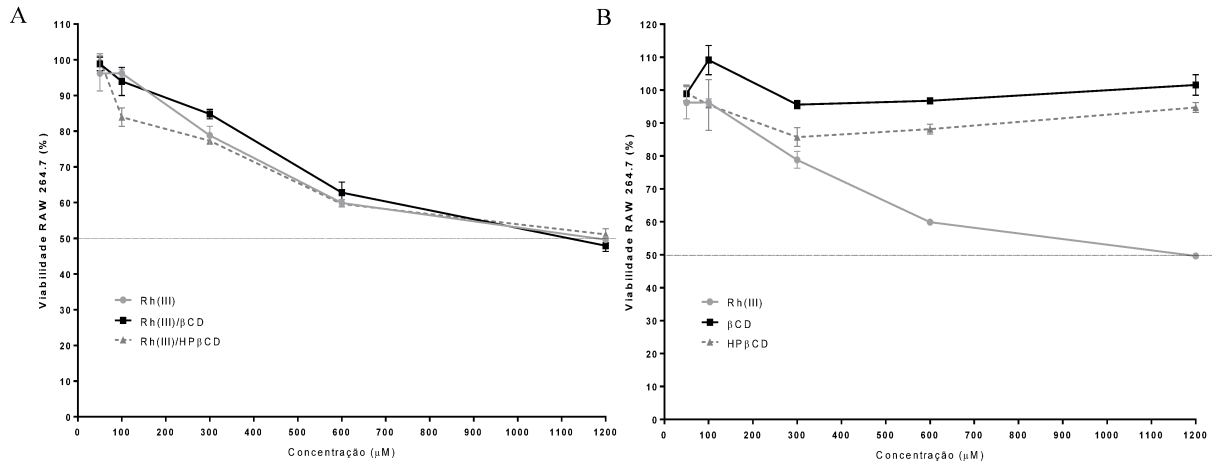
O Rh (III) e os complexos de Rh (III) com ciclodextrinas nas concentrações testadas mantiveram a viabilidade dos macrófagos, tanto em células RAW 264.7 (Tabela 9) como em células J774A.1 (Tabela 10), apresentando em média viabilidade celular superior a 70%, após 48 horas de cultura.

A avaliação da viabilidade celular dos macrófagos também foi utilizada para a determinação do IC₅₀ através da curva de morte após 48 horas de cultura. Na Figura 22 (A e B) são apresentadas as curvas de morte celular de RAW 264.7 em função da variação nas concentrações das substâncias testadas, sendo possível estabelecer o valor de IC₅₀; enquanto que a Figura 23 (A e B) são apresentadas as curvas de morte celular para J774A.1 em função da variação nas concentrações das substâncias testadas, possibilitando estabelecer o valor de IC₅₀.

Conforme apresentado na Figura 22A é possível observar o perfil da curva de morte de RAW 264.7 após o tratamento com diferentes concentrações do Rh (III) e dos complexos. A concentração do Rh (III) necessária para promover alteração em 50 % da viabilidade celular de RAW 264.7 foi de 1090 μ M. Os complexos apresentaram valores de IC₅₀ maiores quando comparados ao Rh (III). O complexo de Rh(III)/ β CD apresentou IC₅₀ de 1100 μ M . Já para o

complexo de Rh(III)/HP β CD o valor de IC₅₀ foi 1 134 μ M, após 48 horas de tratamento de RAW 264.7.

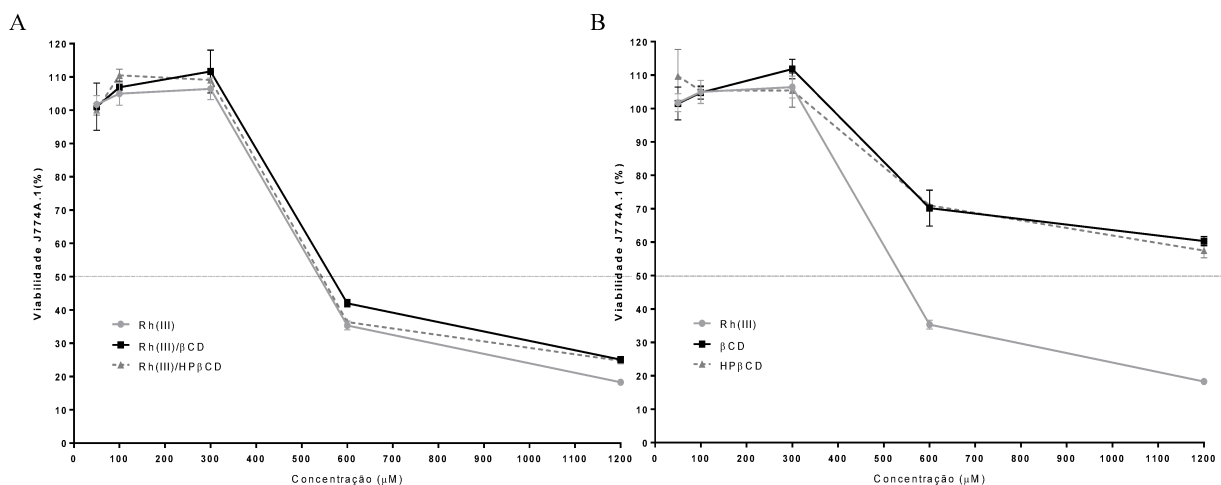
Figura 22— Curvas de morte de macrófagos RAW 264.7 em função de diferentes concentrações do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD, após 48 horas de cultura.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh (III): ródio (III), Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β -ciclodextrina, Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β -ciclodextrina, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, μ M: micromolar.

Figura 23— Curvas de morte de macrófagos J774A.1 em função de diferentes concentrações do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD, após 48 horas de cultura.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III) : ródio (III), Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β -ciclodextrina, Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β -ciclodextrina, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, μ M: micromolar.

Conforme mostra a Figura 23A, o Rh (III) apresentou valor de IC_{50} de aproximadamente 567 μM . O valor de IC_{50} para os complexos de Rh(III)/ βCD e Rh(III)/HP βCD são respectivamente 566 μM e 554 μM , em J774A.1 após 48 horas de tratamento.

Comparando os valores de IC_{50} , foi possível observar que o Rh (III) foi mais citotóxico em macrófagos J774A.1 quando comparado ao RAW 264.7, pois o valor de IC_{50} do Rh (III) para RAW 264.7 foi de 1090 μM e para o J774A.1 foi de aproximadamente 566 μM .

Como citado em materiais e métodos, para controle, as células também foram cultivadas com βCD e HP βCD nas mesmas condições dos complexos de coordenação. As curvas de morte estão apresentadas na Figura 22B e Figura 23B para RAW 264.7 e J774.A1 respectivamente, e o IC_{50} foi maior que 1200 μM .

Embora J774A.1 e RAW 264.7 sejam macrófagos é importante ressaltar que a susceptibilidade destas células mediante diferentes substâncias, podem ter resultados distintos, por exemplo, Gunawardena e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade de metabólitos secundários presentes nas cascas de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Syn e *C. zeylanicum*) da família Lauraceae, em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1. O tratamento das células mostrou que o metabólito secundário cinamaldeído foi mais citotóxico para o macrófago J774A.1 ($IC_{50} = 546 \mu\text{M}$) comparado ao RAW 264.7 ($IC_{50} = 1191 \mu\text{M}$); enquanto que o metabólito benzoato de benzila foi mais citotóxico para RAW 264.7 ($IC_{50} = 117 \mu\text{M}$) em relação a J774A.1 ($IC_{50} = 1646 \mu\text{M}$). Corroborando com o presente trabalho, onde foi observado este comportamento distinto entre as células frente aos compostos testados.

Como anteriormente mencionado, foram identificados poucos trabalhos avaliando a atividade imunomoduladora e potencial atividade anti-inflamatória do Rh (III) e de seus complexos, a maior parte dos estudos têm por objetivo avaliar a atividade antitumoral (LU et al., 2018; THANGAVEL et al., 2016). Estudos da atividade imunomoduladora (MORAGUES et al., 2013) e potencial atividade anti-inflamatória (ZHONG et al., 2016), são mais restritos.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o Rh (III) nas concentrações testadas, não apresentou citotoxicidade nas linhagens de células estudadas. Esse resultado corrobora o estudo realizado por McConnell e colaboradores (2013), mas diferente do objetivo do presente trabalho, avaliaram o efeito antitumoral de complexos orgânicos de Rh (I) frente à linhagem de células de adenocarcinoma colorretal (HCT-116). Como controle as células também foram tratadas com o Rh (III) puro e este não apresentou citotoxicidade.

Lu e colaboradores (2018) avaliaram o potencial antitumoral de complexos de Rh (III) com quinolinonas em quatro linhagens de células tumorais humanas (HepG2, HeLa229, MGC80-3 e NCI-H460). Como controle foi utilizada uma linhagem de células hepáticas

humanas não tumorais (HL-7702). Após 24 horas de tratamento o Rh (III) puro não promoveu alteração da viabilidade em nenhuma das linhagens de células investigadas.

No presente trabalho foi possível observar que os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD também não promoveram alteração da viabilidade celular de macrófagos. Não foi observado na literatura trabalhos que avaliassem a citotoxicidade de complexos de Rh (III) ligados diretamente em ciclodextrinas, somente trabalhos com ligantes organometálicos contendo o Rh, avaliando o efeito citotóxico em macrófagos. Como já citado, Moragues e colaboradores (2013) investigaram a citotoxicidade de complexos binucleares de Rh (III) em macrófagos RAW 264.7, cujos resultados mostraram que o tratamento destas células com estes complexos não alterou a viabilidade dos macrófagos após 48 horas de cultura.

Su e colaboradores (2017) avaliaram o perfil citotóxico de complexos organometálicos de Rh (III) com ligantes curcuminóides em células renais embrionárias humanas (HEK-293T). O tratamento das células mostrou que o complexo organometálico de Rh (III) não apresentou perfil citotóxico frente as células estudadas.

Zhang e colaboradores (2017) avaliaram a citotoxicidade de outros metais de transição, como complexos de rutênio, ósmio e irídio em macrófagos RAW 264.7. Estes complexos nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M não provocaram alteração na viabilidade dos macrófagos após 48 horas de tratamento. Neste mesmo estudo, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MCR-5) para investigar se o efeito destes complexos na viabilidade celular é específico do tipo de célula. Neste caso, o complexo de rutênio foi altamente citotóxico, o complexo de ósmio foi ligeiramente citotóxico e os complexos de irídio não apresentaram efeitos significativos na viabilidade celular de MCR-5 após 48 horas de cultura, demonstrando variação de atividade em diferentes linhagens.

O uso de apenas β CD e HP β CD nas mesmas condições dos complexos de coordenação também não alterou a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 (Tabela 9) e J774.A1 (Tabela 10). No estudo conduzido por Vukic e colaboradores (2019), foi avaliada a citotoxicidade da β CD na linhagem celular HCT-116 e os resultados mostraram que a β CD não interferiu na viabilidade de HCT-116, contribuindo para o conhecimento da não citotoxicidade destas ciclodextrinas.

Pin e colaboradores (2019), também avaliaram a citotoxicidade da α , β e γ -CD nas linhagens de células tumorais (HepG2 e A549) e no fibroblasto de pulmão humano não tumoral. O tratamento das células mostrou que as ciclodextrinas não promoveram alteração na viabilidade das linhagens celulares avaliadas.

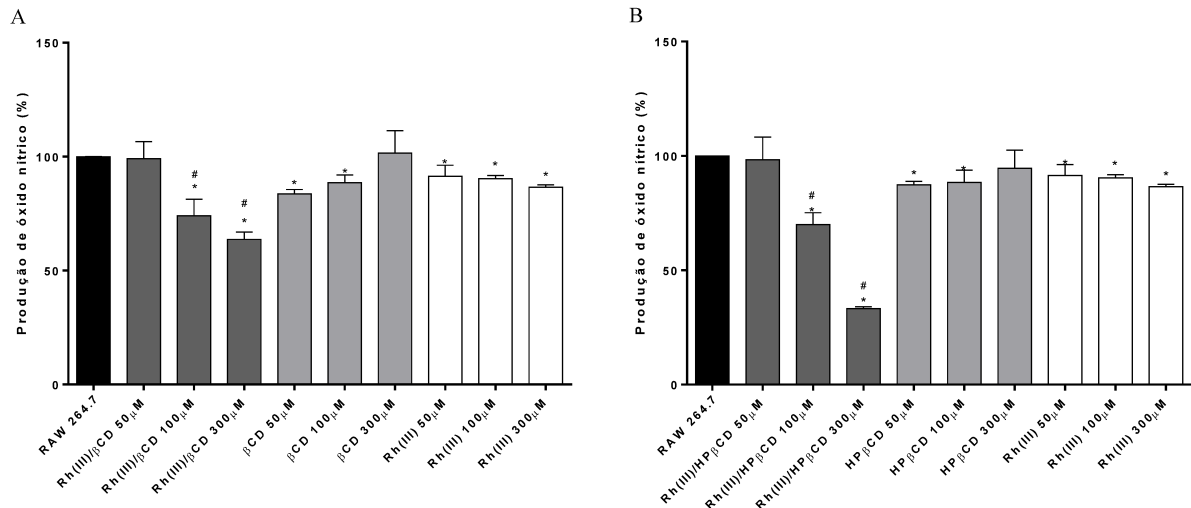
Por meio dos resultados obtidos foi possível observar que o Rh (III) e os complexos, mantiveram a viabilidade dos macrófagos, o que significa que podem ser utilizados para avaliação da atividade imunomoduladora. Assim, os resultados que serão apresentados a seguir em relação à produção de NO e expressão do NF- κ B são oriundos da atividade imunomoduladora dos compostos e não de morte celular.

5.2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ e tratados com o Rh (III) e com os complexos de coordenação

A avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO), indiretamente determinada pela dosagem de nitrito, em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 foi realizada pelo método colorimétrico de Griess. Na Figura 24 são apresentados os resultados da inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 após 48 horas de tratamento com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B). Com os resultados obtidos foi possível observar que o Rh (III) reduziu de maneira significativa a produção de NO em todas as concentrações testadas, e este efeito foi mais acentuado para a maior concentração, em relação ao controle não tratado (RAW 264.7 não tratada).

Ainda na Figura 24, é possível observar que além do Rh (III), que reduziu a produção de NO, os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) também promoveram este efeito. Os complexos de coordenação mostraram-se significativamente ($p < 0,05$) mais ativos que o Rh (III) puro nas concentrações de 100 e 300 μ M na inibição da produção de NO produzidos por macrófagos RAW 264.7. Comparando a inibição promovida pelos complexos, observou-se que o complexo de Rh(III)/HP β CD reduziu a produção de NO a valores significativamente menores ($p < 0,05$) que o complexo de Rh(III)/ β CD a 300 μ M. O complexo de Rh(III)/HP β CD apresentou uma inibição de 67 % na produção de NO, sendo superior ao efeito promovido pelo Rh (III) (14 %). Os resultados demonstraram que a complexação potencializa a atividade inibitória da produção de NO por macrófagos RAW 264.7.

Figura 24— Avaliação da inibição da produção de NO do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 horas de cultura.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

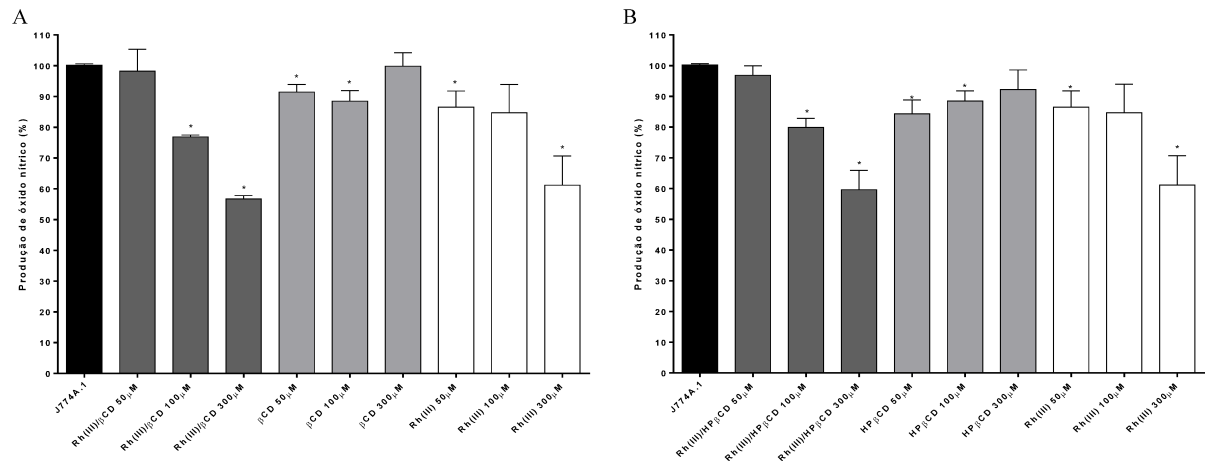
Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β -ciclodextrina,

Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com HP β CD, Rh(III): ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, * $p < 0,05$ RAW 264.7 versus Rh (III) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD. # $p < 0,05$ Rh(III) versus Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD.

A alteração sobre a produção de NO também foi investigada na linhagem de macrófagos J774A.1. Na Figura 25, são apresentados os resultados do tratamento dos macrófagos com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) por 48 horas.

Avaliando-se os resultados apresentados na Figura 25 (A e B), para J774A.1, é possível observar que o Rh (III) foi capaz de reduzir a produção de NO nas concentrações de 50 μ M e 300 μ M. A concentração de 300 μ M, demonstrou efeito inibitório de 40 % da produção do NO. Os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD também foram capazes de reduzir a produção de NO nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M, sendo que a 300 μ M, os complexos apresentaram um efeito inibitório semelhante ao encontrado para o Rh (III), de aproximadamente 40 % da produção de NO, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$).

Figura 25—Avaliação da inibição da produção de NO do Rh (III) puro, Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 horas de cultura.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β -ciclodextrina,

Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β -ciclodextrina, Rh(III):

ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, * $p < 0,05$ J774A.1

versus Rh (III) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD.

Como controle, as células também foram cultivadas com β CD e HP β CD nas mesmas condições dos complexos de coordenação, não apresentaram redução significativa na inibição da produção de NO dos macrófagos RAW 264.7 (Figura 24) e J774.A1 (Figura 25).

Em resumo avaliando-se os efeitos do Rh (III) na inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1, observou-se que o mesmo foi capaz de promover a inibição da produção de NO nas duas linhagens celulares investigadas. A mudança da concentração de NO, é uma avaliação da capacidade das substâncias em atuar como possíveis agentes anti-inflamatórios embora outros mediadores precisem ser avaliados (CHOI et al., 2008; ZHOU et al., 2007).

O resultado do presente trabalho corrobora os estudos de Moragues e colaboradores (2013) e Liu e colaboradores (2014). No trabalho realizado por Moragues e colaboradores (2013) foi relatado o potencial efeito imonumodulador de um complexo binuclear de Rh (III), contendo moléculas de monóxido de carbono (CO) coordenadas, que reduziu a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS.

Do mesmo modo, Liu e colaboradores (2014) investigaram a potencial atividade anti-inflamatória do complexo ciclometalado de ródio (III) em linhagens de macrófagos RAW 264.7

estimulados com LPS. O tratamento destas células promoveu uma redução de 80 % da produção de NO, de maneira dose dependente.

No presente estudo observamos que os complexos foram mais potentes na inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 horas de tratamento, porém está melhor atividade não foi observada para a linhagem de macrófagos J774A.1. A complexação do Rh (III) com ciclodextrinas pode ter favorecido essa melhora nos resultados obtidos em células RAW 264.7, uma vez que estudos demonstram melhoria do efeito anti-inflamatório de fármacos complexados com ciclodextrinas, principalmente na forma de complexos de inclusão, mostrando que o uso desta molécula pode facilitar a interação com sítios de ação.

Por exemplo, Tan e colaboradores (2015) mostraram que o aumento da atividade anti-inflamatória do acetato de hidrocortisona foi devido à formação do CI com β CD. O resultado obtido foi uma inibição mais acentuada na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. O aumento da atividade anti-inflamatória do acetato de hidrocortisona foi atribuído ao estabelecimento de um sistema de liberação controlada após complexação com a β CD.

Giacoppo e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos anti-inflamatórios de uma nova formulação do CI de moringina com α CD utilizando a linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da solubilidade da moringina após complexação com α CD foi fundamental para aumentar a atividade biológica da substância e, portanto, reduzir a produção de mediadores inflamatórios como TNF, IL-1 β e NF- κ B.

Mais recentemente, Silva e colaboradores (2019) sintetizaram, caracterizaram e avaliaram a atividade anti-inflamatória dos complexos de inclusão de α , β -amina, uma mistura de triterpenos pentacíclicos, com β CD e HP β CD. A atividade anti-inflamatória foi investigada utilizando a linhagem de macrófagos J774A.1. Os resultados obtidos mostraram que os complexos de inclusão promoveram uma maior porcentagem de inibição da produção de NO quando comparada à α , β -amina pura.

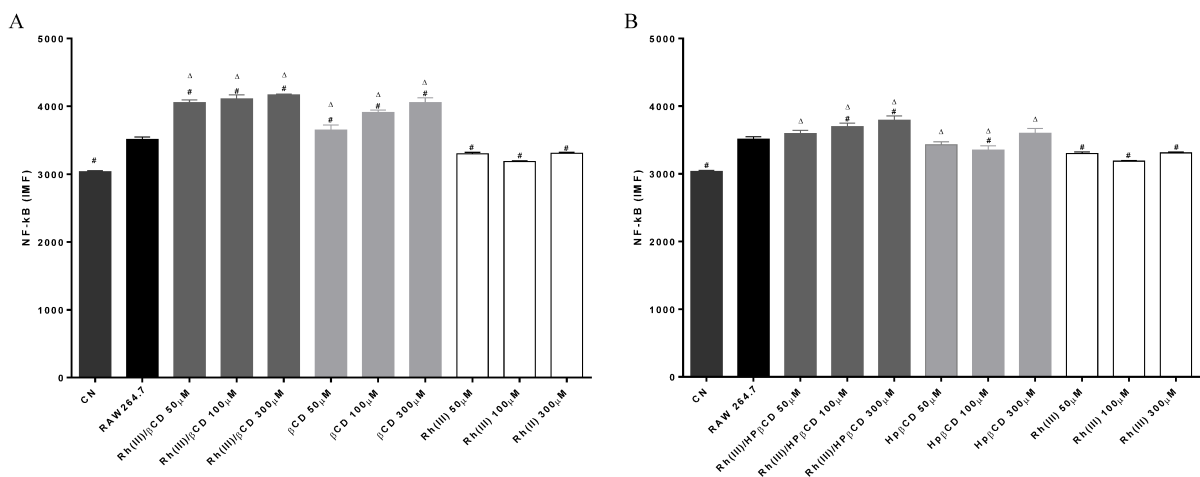
Assim, o presente trabalho corrobora os estudos acima citado no sentido que mostram que as ciclodextrinas foram capazes de promover uma melhoria na ação das substâncias a qual foram complexadas. Em geral, pode-se observar que todos os compostos foram capazes de promover a redução da produção de NO em macrófagos murinos, porém o mecanismo não foi esclarecido, sendo necessário investigar novas vias.

5.2.3 Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de coordenação na expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 estimulados com LPS e IFN- γ

A citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a análise e quantificação de células ou partículas biológicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite verificar vários parâmetros simultaneamente, através da dispersão da luz frontal (*forward scatter*- FSC), que se correlaciona com o volume celular, luz lateral (*side scatter*-SSC), que estabelece a complexidade morfológica da célula e também a fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais (ADAN et al., 2017).

Na Figura 26 são apresentados os resultados da expressão por mediana da intensidade de fluorescência (MIF) do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B);

Figura 26— Expressão por mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A,B), Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).



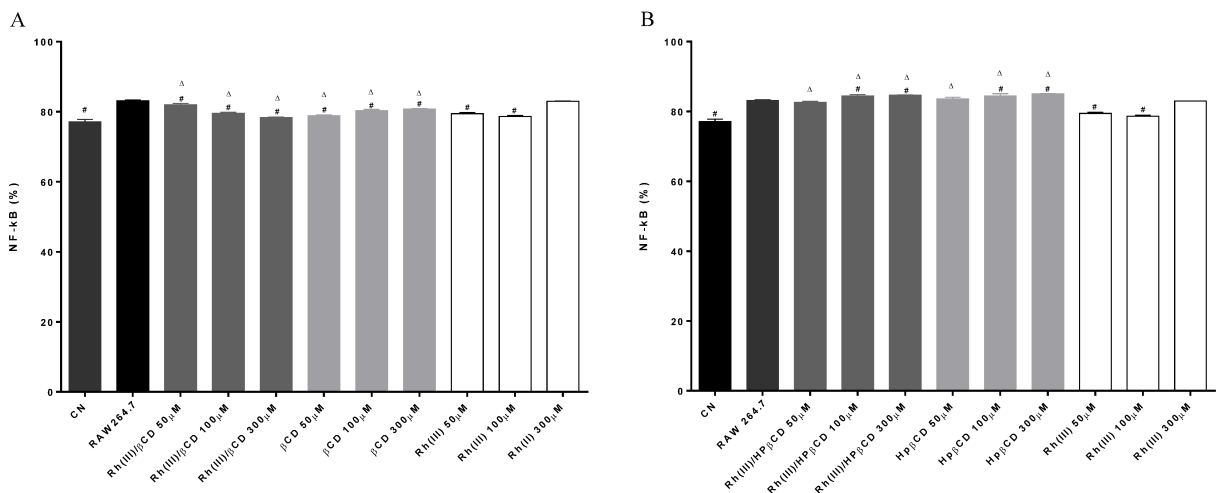
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β - ciclodextrina , Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β - ciclodextrina, Rh(III): ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. NF- κ B: fator nuclear kappa B. MIF: mediana de intensidade de fluorescência. # p<0,05 RAW264.7 versus controle negativo (CN) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD ou Rh (III). Δ p<0,05 Rh (III) versus Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD comparando na mesma concentração.

Os resultados apresentados na Figura 26 demonstram que o Rh (III) foi capaz de reduzir a expressão por MIF do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos RAW 264.7, em todas as concentrações testadas. Já para os complexos este efeito não foi observado, os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) aumentaram a expressão do NF- κ B.

Na Figura 27 estão apresentados os resultados da porcentagem (%) de expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).

Figura 27— Porcentagem (%) de expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A,B), Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).



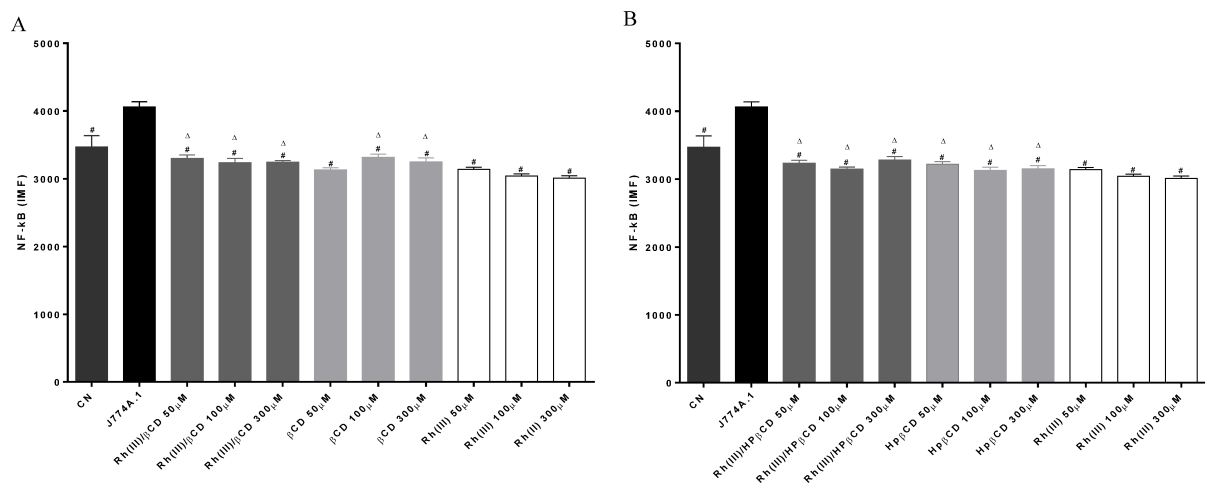
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β -ciclodextrina, Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β -ciclodextrina, Rh(III): ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. NF- κ B: fator nuclear kappa B. %: porcentagem. # $p < 0,05$ RAW264.7 *versus* controle negativo (CN) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD ou Rh (III). Δ $p < 0,05$ Rh (III) *versus* Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD comparando na mesma concentração.

O Rh (III) nas concentrações de 50 e 100 μ M foi capaz de reduzir a expressão do NF- κ B. Entre os complexos, apenas o complexo de Rh(III)/ β CD (A) nas três concentrações testadas promoveu redução significativa da expressão do NF- κ B. O complexo de Rh(III)/HP β CD (B) aumentou a expressão do NF- κ B.

Na Figura 28 estão apresentados os resultados da expressão por mediana da intensidade de fluorescência (MIF) do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).

Figura 28— Expressão por mediana da intensidade de fluorescência (MIF) do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A, B) Rh(III)/ β CD (A), e Rh(III)/HP β CD (B).



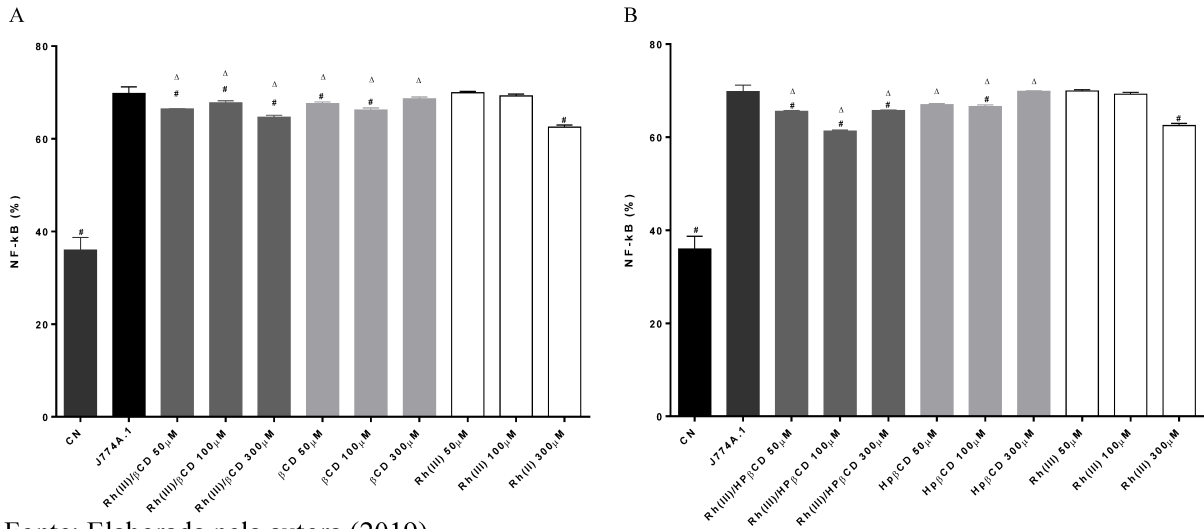
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β - ciclodextrina , Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β - ciclodextrina, Rh(III): ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. NF- κ B: fator nuclear kappa B. MIF: mediana de intensidade de fluorescência. # p<0,05 J774A.1 versus controle negativo (CN) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD ou Rh (III). Δ p<0,05 Rh (III) versus Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD comparando na mesma concentração.

Por meio dos resultados obtidos é possível observar que o Rh (III) foi capaz de promover redução na expressão do NF- κ B nas três concentrações testadas. Os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) nas três concentrações testadas também promoveram redução da expressão do NF- κ B.

Na Figura 29 estão apresentados os resultados da porcentagem (%) de frequência do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (A e B), e com os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B).

Figura 29— Porcentagem (%) da expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento com o Rh(III), Rh(III)/ β CD (A), e Rh(III)/HP β CD (B).



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Legenda: Rh(III)/ β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com β - ciclodextrina , Rh(III)/HP β CD: complexo de coordenação do ródio (III) com hidroxipropil- β - ciclodextrina, Rh(III): ródio (III) puro, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. NF- κ B: fator nuclear kappa B. %: porcentagem. # $p < 0,05$ J774A.1 *versus* controle negativo (CN) ou Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD ou Rh (III). Δ $p < 0,05$ Rh (III) *versus* Rh(III)/ β CD ou Rh(III)/HP β CD ou β CD ou HP β CD comparando na mesma concentração.

Os resultados apresentados na Figura 29 demonstram que o Rh (III) a 300 μ M reduziu a expressão do NF- κ B. Os complexos de Rh(III)/ β CD (A) e Rh(III)/HP β CD (B) nas três concentrações testadas promoveram redução na expressão do NF- κ B.

Avaliando os resultados da expressão do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 horas de tratamento observou-se que o Rh (III) foi capaz de promover redução da expressão do NF- κ B nas duas linhagens de células estudadas. Este resultado corrobora com o estudo realizado por Liu e colaboradores (2014) que sintetizaram e avaliaram a potencial atividade anti-inflamatória de um complexo ciclometalado de Rh (III) em macrófagos RAW 264.7 e observaram a redução da expressão do fator de transição NF- κ B.

Além do Rh (III) o metal níquel também já foi avaliado em relação ao potencial inibidor de NF- κ B. Shawish e colaboradores (2014) relataram a atividade anti-inflamatória de um complexo de tiossemicarbazona com níquel (II) ao mostrarem que a expressão, induzida por

LPS, de genes alvos do fator de transcrição NF- κ B foi reduzida após tratamento dos macrófagos RAW 264.7. Além disso, foi investigada a expressão do fator de transcrição NF- κ B em células HeLa S3 estimuladas com TNF- α . O tratamento destas células com o complexo de tiossemicarbazona de níquel (II) promoveu uma redução acentuada na expressão do NF- κ B.

Outro estudo que também avaliou a potencial atividade anti-inflamatória de um complexo ciclometalado de Rh (III) em linhagens de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) foi realizado por Zhang e colaboradores no ano de 2017. O tratamento dessas células promoveu uma redução da atividade do fator de transcrição NF- κ B. Este resultado foi atribuído ao acúmulo de I κ B induzido pelo composto. Além disso, neste mesmo estudo foi observado que o complexo ciclometalado de Rh (III) promoveu a diminuição da liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

Os complexos de coordenação com Rh (III) apresentaram efeitos diferentes nas linhagens de células estudadas. Não encontramos na literatura trabalhos que avaliassem a expressão do fator de transcrição NF- κ B por macrófagos tratados com complexos de coordenação de Rh (III) com ciclodextrinas.

5.2.4 Avaliação do efeito do Rh (III) e dos complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD no modelo in vivo da indução de edema de pata de camundongos pela carragenina

O modelo da indução de edema em patas de camundongos induzido pela carragenina é um teste amplamente utilizado para determinar o potencial anti-inflamatório de diversas substâncias (POSADAS et al., 2004). A carragenina desencadeia uma resposta inflamatória inicialmente aguda, acompanhada de vasodilatação, exsudação de fluido e migração de células para o local da inflamação (SOHN et al., 2012).

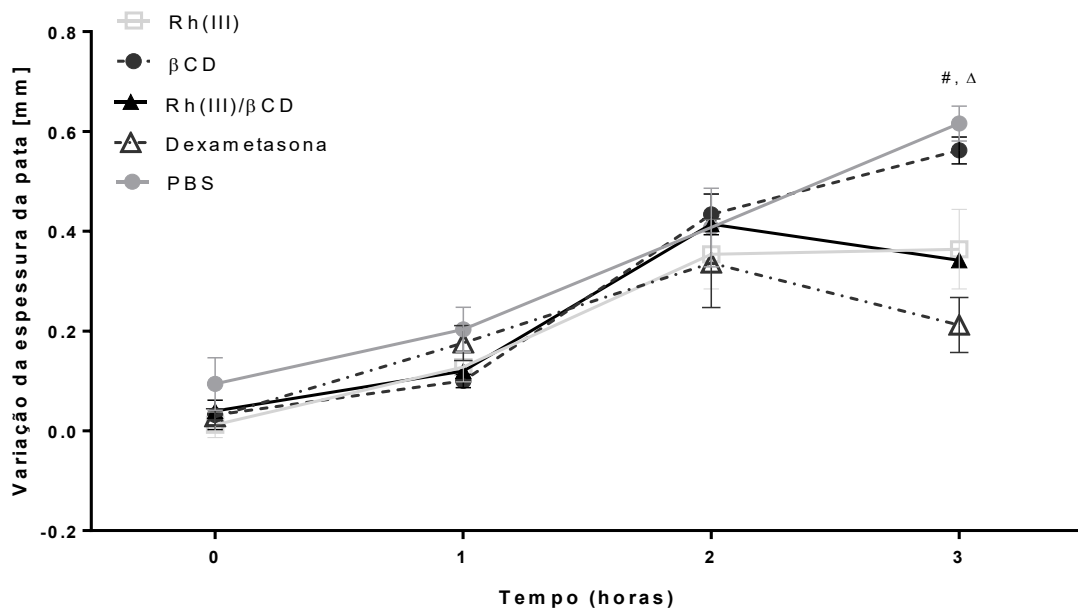
O objetivo desse experimento foi avaliar a resposta do Rh (III) e dos complexos em reduzir o edema induzido pela carragenina em patas de camundongos e a possível atividade anti-inflamatória das substâncias.

A Figura 30 mostra a variação da espessura da pata (mm) após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg), e dexametasona (0,5 mg/Kg).

Assim sendo, é possível observar que na 3^a hora após a indução, os grupos tratados com Rh (III) (5mg/Kg), com o complexo Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg) e com a dexametasona apresentaram redução no edema de pata induzido pela carragenina, sendo estatisticamente diferente do grupo tratado com PBS. É importante ressaltar que não houve diferença entre a

inibição promovida pela dexametasona e os tratamentos com Rh (III) ou com Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg). Além disso, o tratamento com β CD (5mg/Kg) não foi capaz de inibir o edema de pata, apresentando inchaço igual ao tratamento com PBS.

Figura 30—Variação da espessura (mm) do edema induzido pela carragenina em patas de camundongos Balb/c fêmea após 3 horas de tratamento intraperitonealmente com o Rh (III) (5 mg/Kg), β CD (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/ β CD (5 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) e com PBS (100 μ L).

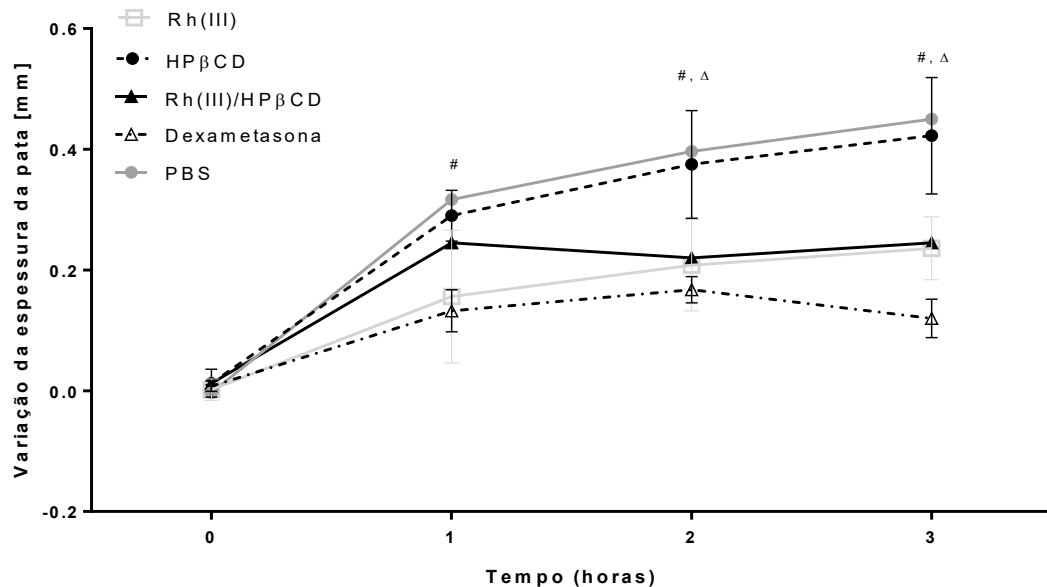


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: Rh(III): Ródio (III), β CD: β -ciclodextrina, Rh(III)/ β CD: complexo de Rh(III) com β CD, PBS: tampão fosfato salino, mm: milímetros. # $p < 0,05$ PBS *versus* dexametasona. Δ $p < 0,05$ PBS *versus* Rh(III), Rh(III)/ β CD.

Na Figura 31 é apresentada a variação da espessura da pata (mm) após 3 horas de tratamento com o Rh (III) (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/HP β CD (5 mg/Kg), e dexametasona (0,5 mg/Kg).

Figura 31—Variação da espessura (mm) do edema induzido pela carragenina em patas de camundongos Balb/c fêmea após 3 horas de tratamento intraperitonealmente com o Rh (III) (5 mg/Kg), HP β CD (5 mg/Kg), com o complexo de Rh(III)/HP β CD (5 mg/Kg), dexametasona (0,5 mg/Kg) e com PBS (100 μ L).



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Legenda: Rh(III): Ródio (III), HP β CD: hidroxipropil- β ciclodextrina, Rh(III)/HP β CD: complexo de Rh(III) com HP β CD, PBS: tampão fosfato salino, mm: milímetros. # $p < 0,05$ PBS *versus* dexametasona. Δ $p < 0,05$ PBS *versus* Rh(III), Rh(III)/HP β CD.

Os tratamentos com o Rh (III) e com o complexo de Rh(III)/HP β CD mostraram redução no edema da pata similar ao grupo que recebeu dexametasona (0,5 mg/Kg), a partir da 2ª hora, sendo diferente estatisticamente dos animais que receberam PBS como tratamento. O tratamento com HP β CD (5mg/Kg) não foi capaz de inibir o edema de pata, sendo igual ao tratamento com PBS. Como controle, os camundongos também foram tratados com β CD (Figura 30) e HP β CD (Figura 31) nas mesmas concentrações (5 mg/Kg) e condições dos compostos, não apresentaram redução no edema de patas de camundongos induzida por carragenina.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento com o Rh (III) (5 mg/Kg) apresentou diferença significativa na redução do edema em patas de camundongos induzidas por carragenina quando comparado ao grupo controle tratado com PBS. Esse resultado corrobora estudos realizados por outros pesquisadores que mostraram a atividade anti-

inflamatória de outras substâncias através do modelo de edema de patas de camundongos induzido por carragenina (ZHONG et al., 2017).

Liao e colaboradores (2012) relataram a atividade anti-inflamatória de constituintes da *Cinnamomum cassia in vitro* em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e através do modelo *in vivo* de indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, onde houve redução da produção de NO, do fator de transcrição NF- κ B e do edema das patas dos camundongos.

Na literatura não foram observados trabalhos que relatassem a potencial atividade anti-inflamatória de complexos de coordenação com o ródio no modelo *in vivo* de edema de patas de camundongos induzidos por carragenina, apenas o trabalho conduzido por Zhong e colaboradores (2017) que mostraram *in vivo* a promissora atividade anti-inflamatória do complexo ciclometalado de Rh (III) no tratamento da doença inflamatória intestinal. No estudo foi utilizado o modelo de camundongos colíticos induzidos por uma solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) e tratados com complexo ciclometalado de Rh (III) (5mg/Kg) O índice de atividade da doença (DAI) foi determinado pela medida da perda de peso corporal e consistência das fezes, com valores mais altos de DAI correlacionados com os sintomas mais graves da doença. Os resultados mostraram que camundongos colíticos não tratados apresentaram um escore DAI máximo de 8,3, enquanto camundongos colíticos tratados com o complexo ciclometalado de Rh (III) mostraram um escore DAI máximo consideravelmente mais baixo de 5,8. Além disso, o complexo ciclometalado de ródio (III) diminuiu os mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β em amostras de tecidos do cólon dos camundongos tratados com o composto.

Os complexos de Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD a 5 mg/Kg também mostraram diferença significativa na redução do edema em patas de camundongos induzidas por carragenina quando comparado com controle tratado com PBS.

Comparando a inibição do edema em patas de camundongos induzido por carragenina promovida pelo Rh (III) puro em relação aos seus complexos, observou-se que não houve diferença significativa na redução do edema em patas de camundongos promovida pelo Rh (III) e pelos complexos de Rh (III) com ciclodextrina. Estudos anteriores que também avaliaram a potencial atividade anti-inflamatória de substâncias complexadas com ciclodextrinas mostraram resultados semelhantes. É possível sugerir que em virtude do fato do Rh (III) já ser uma espécie muito ativa, no modelo utilizado, não foi possível identificar uma melhoria no efeito dos complexos, sobre o processo inflamatório.

Contudo, conforme demonstrado na seção 5.2.2, os complexos de Rh (III) em RAW 264.7 foram mais efetivos em reduzir a produção de NO do que o Rh (III). Por outro lado, o Rh (III) foi mais eficiente em reduzir a expressão de NF- κ B. Considerando que essas duas vias não são totalmente dependentes, tem-se que na presença das ciclodextrinas como ligante provavelmente gera uma alteração do mecanismo de ação do Rh (III), favorecendo a inibição do NO, mas restringindo a via de expressão do fator de transcrição NF- κ B.

Estudo similar, onde o complexo com ciclodextrinas apresentou mesma atividade da substância pura, tem sido citado na literatura, apresentando vantagens distintas daquela esperada para o complexo. Silva e colaboradores (2018) demonstraram a atividade anti-inflamatória da limonina antes e depois da sua complexação com β e γ CD. A limonina, assim como os seus complexos apresentaram redução no edema de patas de camundongos induzidos por carragenina. Os resultados encontrados mostraram que não houve diferença significativa entre a redução do edema de patas de camundongos promovida pela limonina e seus complexos. Entretanto, os autores apontam que os resultados são promissores para a implantação de um sistema de supressão de sabor amargo, após complexação com ciclodextrinas, podendo indicar novas aplicações industriais para os complexos com ciclodextrina.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem o potencial anti-inflamatório do Rh (III) e dos complexos de coordenação do Rh (III), em função da maior atividade moduladora relacionada a redução da expressão do fator de transcrição NF- κ B e do elevado efeito promovido na inibição da produção do NO, respectivamente. Além disso, foi verificada a redução do edema de pata de camundongos, induzidos por carragenina, promovida pelo Rh (III) e dos complexos de coordenação do Rh (III). Porém, estudos de mecanismos moleculares são necessários para esclarecer as vias de ação destes compostos.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que o método de coprecipitação/liofização foi eficiente para a preparação dos dois complexos de coordenação, e que tanto o Rh (III) como os seus complexos Rh(III)/ β CD e Rh(III)/HP β CD foram capazes de modular negativamente mediadores inflamatórios *in vitro*, além de promoverem a redução do edema de pata *in vivo*, demonstrando um possível potencial para o controle de doenças inflamatórias, entretanto, outros estudos são necessários para maiores esclarecimentos das vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. M.; LAWRENCE, T.; KLEIMAN, A.; WARDEN, P.; MEDGHALCHI, M.; TUCKERMANN, J.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A.R. Anti-inflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specific cytosolic phosphatase. **Journal Experimental Medicine**, v. 203, p. 1883-1889, 2006.
- ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A.; Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- ALVES, F. E.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Metais do grupo da platina: história, propriedades e aplicações. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 1, p. 27-33, 2010.
- ALVES, J. M. A. M. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica. Universidade de Lisboa. 2010. 85 p.
- ANNANE, D. Adrenal insufficiency in sepsis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n.19, p. 1882-1886, 2008.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n.10, p. 1-19, 2016.
- BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.883-888, 2002.
- BOOIJ, L. H. D. J. Cyclodextrins and the emergence of sugammadex. **Anaesthesia**, v. 64, n. 1, p. 31-37, 2009.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.
- BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645–666, 2007.
- CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Plantas Medicinal**, v.70, n. 2, p. 93-103, 2004.
- CARVALHO, A.M.R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (o-metil-n-2- hidroxibenzoil tiramina) em modelos experimentais**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- CASTRO, S. B.R.; JUNIOR, C.O.; ALVES, C.C.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; MAZZOCOLI, L.; ZOET, M.T.; FERNANDES, S.A.; TEIXEIRA, H.C.; ALMEIDA, M.V.; FERREIRA, A.P. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL12 and TNF- α in activated J774A.1 cells. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n.3, p. 347–352, 2012.

CELOTTI, F., LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacological Research**, v.43, n. 5, p. 429-436, 2001.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 3-23, 2010.

CHOI, H.J.; EUN, J.S.; PARK, Y.R.; KIM, D.K.; LI, R.; MOON, W.S.; PARK, J.M.; KIM, H.S.; CHO, N.P.; CHO, S.D.; SOH, Y. Ikarisoid A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, p. 171-188, 2008.

CIEMNIECKI, J.A.; LEWIS, C.P.; GUPTON, J.T.; STENGER, K.F. Effects of a Pyrrole based, microtubule depolymerizing compound on RAW 264.7 macrophages. **Chemico Biological Interactions**, v. 246, p. 63–68, 2016.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DA SILVA, W. D.; MOTA, I. (2003) *Bier Imunologia Básica e Aplicada*. Ed. Guanabara Koogan, 5ª edição, Rio de Janeiro, RJ.

DE ARAÚJO, S.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.

DEBRECZENI, J. E.; BULLOCK, A. N.; ATILLA, G. E.; WILLIAMS, D. S.; BREGMAN, H.; KNAPP, S.; MEGGERS, E. Ruthenium half-sandwich complexes bound to protein kinase pim-1. **Angewandte Chemie**, v. 45, n.10, p. 1580-1585, 2006.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DENADAI, A. M.; TEIXEIRA, K. I.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, A. M.; CORTES, M. E.; SINISTERRA, R. D. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, 2007.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DORR, M.; MEGGERS, E. Metal complexes as structural templates for targeting proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 76– 81, 2014.

DORRINGTON, M. G.; FRASER, I. D. C. NF- κ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 705-718, 2019.

DUFOUR, G.; BIGAZZI, W.; WONG, N.; BOSCHINI, F.; DE TULLIO, P.; PIEL, G.; CATALDO, D.; EVRARD, B. Interest of cyclodextrins in spray-dried microparticles formulation for sustained pulmonary delivery of budesonide. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 495, n. 2, p. 869-878, 2015.

ELSAYED, E. A.; ENSHASY, H.; WADAAN, M. A.; AZIZ, R. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

FAN, R.; BIAN, M.; HU, L.; LIU, W. A new rhodium (I) NHC complex inhibits TrxR: *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* hepatocellular carcinoma suppression. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, n. 1, p. 11-17, 2019.

FERREIRA, M.A.; NUNES, O. D.; FONTENELE, J. B.; PESSOA, O. D.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v.11, n. 4, p. 315 – 322, 2004.

FORATO, L. A.; BERNARDES, R. F.; OSIRO, D.; BICUDO, T.; COLNAGO, L. A. A espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos, São Paulo, n. 51, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FREIRE M. O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v.63, n.1, p.149-164, 2013.

GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A.; KRACHT, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 480-499, 2009.

GARG, A.; AGGARWAL, B.B. Nuclear transcription factor- kappaB as a target for cancer drug development. **Leukemia** v. 16, n. 6, p. 1053–1068, 2002.

GEORGE, A.; CHINNAPPAN, S.; CHINTAMANENI, M.; KOTAK, C. V.; CHOUDHARY, Y.; KUEPER, T.; RADHAKRISHNAN, A. K. Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus* (Huds) extract (Lineminus™) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.1-7, 2014.

GIACOPPO, S.; RAJAN, T. S.; IORI, R.; ROLLIN, P.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. The α -cyclodextrin complex of the moringa isothiocyanate suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells through Akt and p38 inhibition. **Inflammation Research**, v. 66, n. 6, p. 487-503, 2017.

GUNAWARDENA, D.; KARUNAWEEERA, N.; LEE, S.; VAN DER KOOY, F.; HARMAN, D. G.; RAJU, R.; BENNETT, L.; GYENGESI, E.; SUCHER, N. J.; MUNCH, G. 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 and Function**, v. 6, n. 3, p. 910-919, 2015.

HALMAN, M.; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R.A. Toll-like receptores as sensores of pathogens. **Pediatric Research**, v.50, n.3, p. 315-321. 2001.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, v.16, n. 5, p.821-847, 2013.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v.23, n.3, p.144-150, 2002.

HASSAN, P. A.; RANA, S.; VERMA, G. Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 3-12, 2015.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035-2044, 1998.

INSTRUTÉCNICA INSTRUMENTAÇÃO PARA PESQUISA E INDÚSTRIA. 1996-2014. Disponível em: <http://www.instrutec.com.br/represen/bic/teoriazeta.html>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva, 2009.

JANSOOK, P.; MOYA-ORTEGA, M. D.; LOFTSSON, T. Effect of self-aggregation of γ cyclodextrin on drug solubilization. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 229-236, 2010.

KARLSEN, T. A.; DE SOUZA, G. A.; ODEGAARD, B.; ENGBRETSSEN, L.; BRINCHMANN, J. E. MicroRNA-140 inhibits inflammation and stimulates chondrogenesis in a model of interleukin 1 β -induced osteoarthritis. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 5, N. 10, p. 64-73, 2016.

KUMARI, A.; SINGLA, R.; GULIANI, A.; YADAV, S. K. Nanoencapsulation for drug delivery. **Journal Experimental and Clinical Science**, v. 13, n. 1, p. 265-286, 2014.

KURKOV, S.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n.1, p. 167-180, 2013.

LANNA, E.G. **Composições nanoestruturadas de *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) Oken com β -ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2015. 161f.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

- LAWRENCE, T; FONG, C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 42, p. 519–523, 2010.
- LEAL, M.C.; CASABONA, M. P.; PITOSI, F. J. Interleukin-1 β and tumor necroses fator- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's disease. **Frontiers in Cell Neuroscience**, v.7, n.53, p.10, 2013.
- LEUNG, C.H.; LIN, S.; ZHONG, H. J.; MA, D. L. Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses. **Chemical Science**, v. 6, p. 871-884, 2015.
- LIAO, J. C.; DENG, J. S.; CHIU, C. S.; HOU, W. C.; HUANG, S. S.; SHIE, P. H.; HUANG, G. J. Anti-inflammatory activities of *ciannomomum cassia* constituents *in vitro* and *in vivo*. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-44, 2012.
- LIU, L.J.; LIN, S.; CHAN, D. S.; WONG, C. T.; MA, D. L.; LEUNG, C. H. A rhodium (III) complex inhibits LPS-induced nitric oxide production and angiogenic activity in cellulose. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 23-28, 2014.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1119-1135, 2011.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. R. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.
- LOFTSSON, T.; DUCHENE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 2, p. 1-11, 2007.
- LOFTSSON, T.; STEFANSSON, E. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 80, n. 2, p. 144-150, 2002.
- LU, X.; WU, Y. M.; YANG, J. M.; MA, F. E.; LI, L. P.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; NI, Q. L.; PAN, Y. M.; HONG, X.; PENG, Y. Preparation of rhodium (III) complexes with 2(1H)-quinolinone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 226-236, 2018.
- MA, D.L.; WANG, M.; MAO, Z.; YANG, C.; LEUNG, C. H. Rhodium complexes as therapeutic agents. **Dalton Transactions**, v. 45, n.7, p. 2762–2771, 2016.
- MA, J.Q.; DING, J.; XIAO, Z.H.; LIU, C.M. Ursolic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney by inhibiting the STAT3 and NF- κ B activities. **International Immunopharmacology** v. 21, n. 2, p. 389–395, 2014.
- MAIONE, F.; RUSSO, R.; KHAN, H.; MASCOLO, N. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. **Natural Products Research**, v.30, n.12, p.1343-1352, 2016.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer – related inflammation. **Nature: Internacional Journal of science**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MATSUI, Y.; KURITA, T.; YAGI, M.; OKAYAMA, T.; MOCHIDA, K.; DATE, T. The formation and structure of copper (II) complexes with cyclodextrins in an alkaline solution. **Bulletin Chemical Society Japan**, v. 48, n. 7, p. 2187–2191, 1975.

MATSUI, Y.; KURITA, T.; DATE, Y. Complexes of copper (II) with cyclodextrins. **Bulletin Chemical Society Japan**, v. 45, n. 10, p. 400-460, 1972.

McCONNELL, J.R.; RANANAWARE, D. P.; RAMSEY, D. M.; BUYS, K. N.; COLE, M. L.; McCALPINE, S. R. 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, 2013.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell**, v.140, n.6, p. 771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MELO, C. P; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v. 9, n. 18, p. 9-21, 2004.

MESSNER, M.; KURKOV, S. V.; JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1, p. 199-208, 2010.

MILHOLLEN, M. A.; TRAORE, T.; ADAMS-DUFFY, J.; THOMAS, M. P.; BERGER, A. J.; DANG, L.; DICK, L. R.; GARNSEY, J. J.; KOENIG, E.; LANGSTON, S. P.; MANFREDI, M.; NARAYANAN, U.; ROLFE, M.; STAUDT, L. M.; SOUCY, T. A.; YU, J.; ZHANG, J.; BOLEN, J. B.; SMITH, P. G. MLN4924, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in diffuse large B-cell lymphoma models: rationale for treatment of NF- κ B-dependent lymphoma. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1515-1523, 2010.

MODLIN, R.L. Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 882–886, 2012.

MORAGUES, M. E.; BRINES, R.; TERCENIO, M.; SANCENON, F.; MARTINES, R. M.; ALCARAZ, M. CO-Releasing binuclear rhodium complexes as inhibitors of nitric oxide generation in stimulated macrophages. **Inorganic Chemistry**, v.52, n.54, p. 13806-13808, 2013.

MORAIS, C. A. S. **Caracterização termodinâmica e estrutural de sistemas supramoleculares envolvendo pentoxifilina e ciclodextrinas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal De Itajubá, Itajubá, p. 67, 2016.

MUHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1247-1255, 2003.

NENNIG, S.E.; SCHANK, J.R. The role of NF- κ B in drug addiction: beyond inflammation. **Alcohol and Alcoholism**, v. 52, n. 2, p. 172-179, 2017.

NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 198-205, 2005.

NIU, Y.L.; GUO Z.; ZHOU R.H. Up-regulation of THF-alpha in neurons of dorsal root ganglia and spinal cord during coronary artery occlusion in rats. **Cytokine**, v.47, p.23-29. 2009.

NORMAN, A. W.; HENRY, H. L. **Hormones**. 3ed. London: Elsevier, 2015. 413 p.

PARK, J.H.; OH, S. M.; LIM, S. S.; LEE, Y. S.; SHIN, H. K.; OH, Y. S.; CHOE, N. H.; KIM, J. H. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, n. 1, p.146-152, 2006.

PASSOS, J. J.; SOUSA, F. B.; MUNDIM, I. R.; BONFIM, R. R.; MELO, R.; VIANA, A. F.; STOLZ, E. D.; BORSOI, M.; RATES, S. M. K.; SINISTERRA, R. D. Double continuous injection preparation method of cyclodextrin inclusion compounds by spray drying. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, n. 15, p. 345-351, 2013.

PASSOS, J. J.; SOUSA, F. B.; MUNDIM, I. R.; BONFIM, R. R.; MELO, R.; VIANA, A. F.; STOLZ, E. D.; BORSOI, M.; RATES, S. M. K.; SINISTERRA, R. D. In vivo evaluation of the highly soluble oral β -cyclodextrin-sertraline supramolecular complexes. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 436, n.2, p. 478-485, 2012.

PATEL, T.; ZHOU, J.; PIEPMEIER, J. M.; SALTZMAN, W. N. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 701-705, 2012.

PATIL, K.R.; MOHAPATRA, P.; PATEL, H. M.; GOYAL, S. N.; OJHA, S.; KUNDU, C. N.; PATIL, R. R. Pentacyclic triterpenoids inhibit ikk β mediated activation of nf-kb pathway: In silico and in vitro evidences. **Public Library of Science**, v. 10, n. 5, p. 1–30, 2015.

PELLETIER, J. M.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatoids Diseases**, v.62, p.501-509, 2003.

PIN, L.V.; DONGJING, Z.; MENGBI, G.; JING, L.; XUAN, C.; RONG, G.; YANPING, X.; QINGYING, Z.; YING, L. 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, 2019.

PODUST, V. N.; BROWNELL, J. E.; GLADYSHEVA, T. B.; LUO, R. S.; WANG, C.; COGGINS, M. B.; PIERCE, J. W.; LIGHTCAP, E. S.; CHAU, V. A NEDD8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4579-4584, 2000.

- POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.
- PROCHOWICZ, D.; KORNOWICZ, A.; JUSTYNIAK, I.; LEWINSKI, J. Metal complexes based on cyclodextrins: synthesis and structural diversity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 306, n.1 p. 331-345, 2016.
- PROCHOWICZ, D.; KORNOWICZ, A.; LEWINSKI, J. 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, 2017.
- RAZA, A.; SUN, H.; BANO, S.; ZHAO, Y.; XU, X.; TANG, J. Preparation, characterization, and in vitro anti-inflammatory evaluation of novel water-soluble kamebakaurin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 319-326, 2017.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (2001) Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional. Ed. Guanabara Koogan, 6ª edição. Rio de Janeiro, RJ.
- RODRIGUES, L.B.; MARTINS, A. O.; RIBEIRO, J. C.; CASTRO, F. F.; ALBUQUERQUE, T. R.; FERNANDES, M. N.; SILVA, B. A.; QUINTANS, L. J.; ARAUJO, A. A. S.; MENEZES, P. D.; NUNES, P. S.; MATOS, I. G.; COUTINHO, H. D. M.; GONCALVES, W. A.; MENEZES, I. R. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, n. 2, p. 836-846, 2017.
- SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion-compounds in research and industry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 19, n. 1, p. 344-362, 1980.
- SANNA, V.; SIDDIQUI, I. A.; SECHI, M.; MUKHTAR, H. Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 10, p. 3871-3881, 2013.
- SANTOS, A. C.; PEREIRA, M. S.; FERREIRA, L.; CALDAS, M.; COLLADO, M. G.; MAGALHAES, M.; FIGUEIRAS, A.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: effects on resveratrol *in vivo* bioavailability and bioactivity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, n. 1, p. 127-140, 2019.
- SANTOS, L.V. **Síndrome de Cushing causada pelo excesso de glicocorticoides**. 35f. 2017. Monografia (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2017.
- SANTOS-FERNANDES, R.F. MEIRA, C. S.; COSTA, R. D.; SOUZA, O. P.; EVANGELISTA, A. F.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, G. M.; VELOZO, E. D. S.; VILLARREAL, C. F.; PEREIRA, S. The anti-inflammatory and immunomodulatory potential

of braylin: pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches. **Public Library of Science**, v. 12, n. 6, p. 1-20, 2017.

SARINHO, E. S. C.; MELO, V. M. P. P. Glucocorticoid-induce bone disease: mechanisms and importance in pediatric practice. **Revista Paulista de Pediatria**. v. 35, n. 2, p. 207-215, 2017.

SCHER, J.U.; PILLINGER, M. H. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. **Journal of Investigative Medicine**, v. 57, n. 6, p. 703-708, 2009.

SCHIMMEL, L.; HEEMSKERK, N.; BUUL, J. D. V. Leukocyte transendothelial migration: a local affair. **Small GTPases**, v.8, p.1-15, 2016.

SELVA, L. R.; LIN, P. H.; CHANG, Y.; CHEN, W. Y. Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p.85-98, 2010.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews**, v. 8, p. 349-361, 2008.

SHAWISH, H.B.; WONG, W. Y.; WONG, Y. L.; LOH, S. W.; LOOI, C. Y.; HASSANDARVISH, P.; PHAN, A. Y.; WONG, W. F.; PATERSON, I. C.; CK, E. A.; MUSTAFA, M. R.; MAAH, M. J. Nickel (II) complex of polyhydroxybenzaldehyde n-4thiosemicarbazone exhibits anti-inflammatory activity by inhibiting NF- κ B transactivation. **Public Library of Science**, v. 9, n.6, p. 1-13, 2014.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. **Química Inorgânica**. 4ª. Ed., Porto Alegre: Bookman, 2008.

SILVA, P. V. da. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e Ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2015. 77 p.

SILVA, S.V. A.; CLEMENTE, A.; ROCHA, J.; DIREITO, R.; MARQUES, H. C.; SEPODES, B.; FIGUEIRA, M. E.; RIBEIRO, M. H. Anti-inflammatory effect of limonin from cyclodextrin (un)processed orange juices in *in vivo* acute inflammation and chronic rheumatoid arthritis models. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 146-153, 2018.

SILVA, W.F.; BEZERRA, D. L. M.; OLIVEIRA, L. C.; KOESTER, L. S.; OLIVEIRA, P. D. A.; LIMA, E. S.; AZEVEDO, E. P.; VEIGA, V. F. J.; NEVES, A. A. Inclusion complexes of α and HP β -cyclodextrin with α,β -amyrin and in vitro anti-inflammatory activity. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p.241, 2019.

SOHN, K.H.; JO, M. J.; CHO, W. J.; LEE, J. R.; CHO, I. J.; KIM, S. C.; KIM, Y. W.; JEE, S. Y. Bojesodok-eum, a herbal prescription, ameliorates acute inflammation in association with the inhibition of NF- κ B-mediated nitric oxide and proinflammatory cytokines production. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

SOMA, D.; ATTARI, Z.; REDDY, M. S.; DAMODARAM, A.; KOTESHWARA, K. B. G. Solid lipid nanoparticles of irbesartan: preparation, characterization, optimization and

pharmacokinetic studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-10, 2017.

SORRIENTO, D.; ILLARIO, M.; FINELLI, R.; IACCARINO, G. To NF κ B or not to NF κ B: The Dilemma on How to Inhibit a Cancer Cell Fate Regulator. **Translational medicine @ UniSa** v. 4, n. 9, p. 73–85, 2012.

SOUSA, F. B. **Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica de compostos de inclusão formados entre antidepressivos e ciclodextrinas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 74, 2007.

SOUSA, F.B. LIMA, A. C.; DENADAI, A. M.; ANCONI, C. P.; DE ALMEIDA, W. B.; NOVATO, W. T.; DOS SANTOS, H. F.; DRUM, C. L.; LANGER, R.; SINISTERRA, R. D. Superstructure based on β -CD self-assembly induced by a small quest molecule. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 6, p. 1934-1944, 2012.

STEARNS-KUROSAWA, D.J.; OSUCHOWSKI, M. F.; VALENTINE, C.; KUROSAWA, S.; REMICK, D. G. The Pathogenesis of Sepsis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 6, p. 19 – 48, 2011.

SU, W.; WANG, X.; LEI, X.; XIAO, Q.; HUANG, S.; LI, P. Synthesis, characterization, cytotoxic activity of half-sandwich rhodium(III), and iridium(III) complexes with curcuminoids. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 833, n.15, p. 54-60, 2017.

SUÁREZ, D. F.; CONSUEGRA, J.; TRAJANO, V. C.; GONTIJO, S. M.; GUIMARAES, P. P.; CORTES, M E.; DENADAI, A. L.; SINISTERRA, R. D. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β - cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 194-201, 2014.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TAN, L.; LI, J.; LIU, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Z.; DENG, L. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin-conjugated alginate hydrogel for controlled release of hydrocortisone acetate in response to mechanical stimulation. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 30, n. 6, p.584-599, 2015.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C. B.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. PAMPs and DAMPs: signal that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158-175, 2013.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. **European Journal of Pharmacology**, v.579, n. 3, p.1-12, 2008.

THANGAVEL, S.; PAULPANDI, M.; FRIEDRICH, H. B.; MURUGAN, K.; KALVA, S.; SKELTON, A. A. Synthesis, characterization, antiproliferative and molecular docking study of new half sandwich Ir (III), Rh (III) and Ru (II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p. 50-61, 2016.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - Enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 101-104, 1997.

THOMPSON, K.H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Transactions**, v. 14, n. 6, p. 761-764, 2006.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 2, p. 51-70, 2007.

UEKAMA, K.; IRIE, T. New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical application cyclodextrins derivatives as new drugs carriers. **Internacional Journal of Pharmaceutical**, v.271, n.2, p.155-165, 2004.

VALET, G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 17, n. 3, p. 213-222, 2003.

VEIGA, M. D.; MERINO, M.; FERNANDEZ, D.; LOZANO, R. Characterization of some cyclodextrin derivatives by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, 511-516, 2002.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VILLAVERDE, J.; MORILLO, E.; PEREZ-MARTINEZ, J. I.; GINES, J. M.; MAQUEDA, C. Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and β -Cyclodextrin To Improve Herbicide Formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 864-869, 2004.

VINEGAR, R.; SHREIBER, W.; HOGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969.

VUKIC, M.D.; VUKOVIC, N. L.; POPOVIC, S. L.; TODOROVIC, D. V.; DJURDJEVIC, P. M.; MATIC, S. D.; MITROVIC, M. M.; POPOVIC, A. M.; KACANIOVA, M. M.; BASKIC, D. D. Effect of β -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, 2019.

WANG, F.; YANG, B.; ZHAO, Y.; LIAO, X.; GAO, C.; JIANG, R.; HAN, B.; YANG, J.; LIU, M.; ZHOU, R. Host-guest inclusion system of scutellarein with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation, characterization, and anticancer activity. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 6, p. 594-607, 2014.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; KANNAPPAN, R.; AGGARWAL, B. B. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. **Toxins**, v. 2, n. 10, p. 2428–2466, 2010.

YAO, Q.; YOU, B.; ZHOU, S.; CHEN, M.; WANG, Y.; LI, W. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: a combined spectroscopy, TG/DSC and DFT study. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, n. 1, p. 576-586, 2014.

YILMAZ, V. T.; SULU, M.; YAZICILAR, T. K. Decomposition of rhodium and iridium complexes of tripodal phosphine derivatives studied by thermal analysis. **Thermochemica Acta**, v. 366, n. 3, p. 71-78, 2001.

YUAN, C.; LIU, B.; LIU, H. Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, n. 2, p. 39-40, 2015.

ZHANG, C.; XU, S. H.; MA, B. L.; WANG, W. W.; YU, B. Y.; ZHANG, J. New derivatives of ursolic acid through the biotransformation by *Bacillus megaterium* CGMCC 1.1741 as inhibitors on nitric oxide production. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2575–2578, 2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p.27-37, 2007.

ZHANG, J.; PITTO-BARRY, A.; SHANG, L.; BARRY, N. P. E. Anti-inflammatory activity of electron-deficient organometallics. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, p.70-78, 2017.

ZHONG, H. J.; YANG, H.; CHAN, D. S.; LEUNG, C. H.; WANG, H. M.; MA, D. L. A metal-based inhibitor of NEDD8-activating enzyme. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p 1-9, 2012.

ZHONG, H. J.; WANG, W.; KANG, T. S.; YAN, H.; YANG, Y.; XU, L.; WANG, Y.; MA, D. L.; LEUNG, C. H. A Rhodium (III) complex as an inhibitor of neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8-activating enzyme with in vivo activity against inflammatory bowel disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 497–503, 2017.

ZHOU, H.Y.; SHIN, E. M.; GUO, L. Y.; ZOU, L. B.; XU, G. H.; LEE, S. H.; ZE, K. R.; KIM, E. K.; KANG, S. S.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory activity of 21(alpha,beta)-methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, n. 2, p. 239-248, 2007.

ANEXO A – Comitê de Ética em Experimentação Animal

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS															
<h3 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h3>																
Teófilo Otoni, 16 de julho de 2019.																
<p> Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO <i>in vivo</i> DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE COMPLEXOS DE RÓDIO COM CICLODEXTRINAS EM MODELO INFLAMATÓRIO DE EDEMA DE PATA", registrada com o nº 01-2019 R, 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/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 17ª Reunião Ordinária, no dia 09 de julho de 2019. </p>																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 35%;">Finalidade</td> <td>() Ensino (X) Pesquisa Científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da Autorização</td> <td>19/08/2019 a 18/08/2023</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td>Camundongo isogênico Balb/c</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>Peso/Idade</td> <td>18g / 3 a 4 semanas</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Fêmea</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>CEBIO-ICB-UFMG</td> </tr> </table>			Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	Vigência da Autorização	19/08/2019 a 18/08/2023	Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Balb/c	Nº de animais	150	Peso/Idade	18g / 3 a 4 semanas	Sexo	Fêmea	Origem	CEBIO-ICB-UFMG
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica															
Vigência da Autorização	19/08/2019 a 18/08/2023															
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Balb/c															
Nº de animais	150															
Peso/Idade	18g / 3 a 4 semanas															
Sexo	Fêmea															
Origem	CEBIO-ICB-UFMG															
<p> <i>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.</i> </p>																
<p> <i>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.</i> </p>																
 Sarah Alves Auharek Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM																
Campus do MUCURI Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM Prédio do ICET, sala 217 – Rua do Cruzeiro, 01 – Jardim São Paulo – Teófilo Otoni/MG – CEP 39803-371 Telefone: +55 (33) 3529-2700																