

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

Juliane de Carvalho Albuquerque

**Complexo de Ródio (III) com Policiclodextrina: síntese, caracterização e
avaliação da sua atividade em sistemas biológicos**

Governador Valadares

2022

Juliane de Carvalho Albuquerque

**Complexo de Ródio (III) com Policiclodextrina: síntese, caracterização e
avaliação da sua atividade em sistemas biológicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Governador Valadares

2022

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

Albuquerque, Juliane de Carvalho .

Complexo de Ródio (III) com Policiclodextrina: síntese, caracterização e avaliação da sua atividade em sistemas biológicos / Juliane de Carvalho Albuquerque. -- 2022.

111 f. : il.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

1. Policiclodextrina. 2. Ródio. 3. Imunomodulação. I. Denadai, Ângelo Márcio Leite , orient. II. Título.

Juliane de Carvalho Albuquerque

Título: Complexo de Ródio (III) com policiclodextrina: síntese, caracterização e avaliação da sua atividade em sistemas biológicos.

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

Aprovada em 5 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr(a). Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Dr(a). Pedro Henrique Ferreira Marçal

Universidade Vale do Rio Doce

Dr(a). Rodrigo Moreira Verly

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Dr(a). David Henrique Rodrigues

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Dr(a). Lucia Alves de Oliveira Fraga

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Juiz de Fora, 22/06/2022.



Documento assinado eletronicamente por **PEDRO HENRIQUE FERREIRA MARCAL, Usuário Externo**, em 05/08/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Moreira Verly, Usuário Externo**, em 05/08/2022, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **David Henrique Rodrigues, Vice-Chefe de Departamento**, em 05/08/2022, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliane de Carvalho Albuquerque, Servidor(a)**, em 05/08/2022, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a)**, em 05/08/2022, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelo Marcio Leite Denadai, Diretor (a)**, em 09/08/2022, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0838383** e o código CRC **42D062AC**.

Desde o início da minha graduação meu pai adorava dizer: “Minha filha vai ser doutora!”.
Cá estou e dedico a você, pai!

AGRADECIMENTOS

a.gra.de.cer

1. demonstrar gratidão por benefício recebido

2. retribuir

E quantos benefícios recebidos nesses quatro anos de doutoramento! Tanto aprendizado, tanta troca de conhecimento, tantas experiências... E quanto eu tenho a retribuir agora! Seguir trocando conhecimento, ensinando e aprendendo, fazendo a roda da ciência girar.

Deus, quanta gente fez parte dessa aventura chamada doutorado! Foi tanta gente boa, cada uma com seu jeito de contribuir para a conclusão dessa etapa tão importante da minha vida. Agradeço à cada um dos professores do PMBqBM, que compartilharam comigo seu saber durante esse tempo, em especial à professora Sandra Bertelli e ao professor Jeferson Silva, por tanta disponibilidade, paciência e colaboração! Agradeço também aos professores Leonardo Meneghin e Caio Ribeiro e aos colegas Paloma e Allan pela contribuição fundamental nos experimentos.

Ao meu orientador, professor Ângelo Denadai, que me ensinou coisas tão diferentes das que eu estava acostumada, que me conduziu por um multiverso do conhecimento pelo qual eu jamais havia imaginado passar, muito obrigada!

Sem amigos a gente não é ninguém! Mariany, Graziella e Duílio me ajudaram tanto fazendo meu dia a dia mais leve no trabalho, sempre segurando a onda quando eu precisei. Obrigada, meus queridos!

Se sem amigos a gente não é ninguém, imagina sem família... essa é a base de tudo! Obrigada, mainha, por me mostrar desde criança que o céu é meu limite, que eu posso ir aonde eu quiser, que eu posso ser o que eu quiser! Simone e Suzane, quando vocês vibram comigo pelas minhas conquistas eu me sinto muito mais realizada, isso me impulsiona! Obrigada por virem sempre comigo!

Tê e Haruf, vocês dois grandes exemplos de doutores para mim, me inspiram! Obrigada por me orientarem, me apoiarem, por estarem sempre por perto!

Parece que esses quatro anos passaram rápido, né, Manoel? Parece que eu passei serenamente por esse período, que eu não estive ausente por diversos momentos, que eu não me estressei, não chorei, que não foi difícil conviver comigo, que eu não tive vontade de desistir... só parece. E quem esteve comigo todos os dias

aguentando cada momento difícil, me incentivando a continuar, me encorajando, acreditando em mim quando até eu mesma duvidava? Você! Obrigada por ser meu melhor amigo, meu companheiro de todas as horas, meu maior incentivador, meu amor!

Deixo a minha gratidão ainda a todas as pessoas que se alegram comigo pelas minhas conquistas!

Meu Deus, obrigada por tudo isso!

RESUMO

O tratamento das doenças inflamatórias enfrenta grandes desafios relacionados aos efeitos indesejados dos anti-inflamatórios atualmente disponíveis, além da carência de medicamentos para tratar doenças inflamatórias crônicas e autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla, entre outras. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos. Dentro deste contexto, é importante ressaltar a importância da nanomedicina, que dispõe de ferramentas que permitem o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos com a utilização de nanoestruturas como ciclodextrinas. As ciclodextrinas se destacam por sua excelente biocompatibilidade e capacidade de formar complexos tanto supramoleculares, quanto de coordenação. Entretanto, em formulações complexas, pode haver dissociação dos compostos devida à competição com outras espécies químicas presentes no meio. A polimerização de ciclodextrinas representa uma estratégia para ampliar sua capacidade de complexação. O ródio é um dos metais de transição que compõem o grupo da platina e o conhecimento sobre seu efeito antitumoral existe há várias décadas, entretanto, nos últimos anos a possível atividade anti-inflamatória dessa classe de metais tem sido investigada. Dessa forma, o presente estudo objetivou sintetizar, caracterizar e avaliar as atividades biológicas do complexo de coordenação de ródio (III) com policiclodextrina. A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia de infravermelho, pela qual foi possível observar mudanças em vários modos vibracionais da pCD após a formação do complexo; por ressonância magnética nuclear de ^1H , que confirmou as interações intermoleculares ocorridas durante a formação do complexo por variações no deslocamento químico dos sinais de hidrogênio. A titulação calorimétrica isotérmica mostrou que a complexação é direcionada por entalpia e por entropia, com estequiometria 1:3. A avaliação das atividades biológicas *in vitro* foi realizada através de ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, determinação da produção de óxido nítrico e avaliação da expressão do fator de transcrição NF- κ B e mostrou que o complexo sintetizado promoveu a diminuição da produção de óxido nítrico e da expressão de NF- κ B nas linhagens de macrófago RAW 264.7 e J774A.1 mantendo a viabilidade celular e sem promover danos ao seu material genético. Para avaliação *in vivo* foram utilizados os modelos de indução de edema de pata em camundongos pela inoculação de

carragenina (inflamação aguda) e pela inoculação de ovalbumina (hipersensibilidade tardia). Os resultados mostraram que o ródio promoveu a redução do edema de pata de forma semelhante à dexametasona. Foi mostrado ainda que o complexo também reduziu o edema, e que esse fato está relacionado ao potencial da policiclodextrina em otimizar a atividade do ródio. Maiores estudos devem ser realizados para avaliar as vias que estão envolvidas na atividade anti-inflamatória dos complexos de coordenação à base de ródio para viabilizar a exploração do seu potencial.

Palavras-chave: policiclodextrinas, ródio, imunomodulação.

ABSTRACT

The treatment of inflammatory diseases faces major challenges related to the unwanted effects of currently available anti-inflammatory drugs, in addition to the lack of drugs to treat chronic inflammatory and autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, among others. Therefore, the development of new pharmacological agents becomes necessary. In this context is important to highlight that nanomedicine has tools that allow the development of controlled drug release systems using nanostructures like cyclodextrins. Cyclodextrins stand out in this context for their excellent biocompatibility and ability to form coordination complexes, however, in complex formulations, there may be dissociation of the compounds due to competition with other chemical species present in the medium. The polymerization of cyclodextrins represents a strategy to increase their complexation capacity. Rhodium is one of the metals that make up the platinum group and knowledge about its antitumor effect has existed for several decades due to the cytotoxic activity of transition metals, however, in recent years the possible anti-inflammatory activity of this class of metals has been investigated. Thus, the present study aimed to synthesize, characterize and evaluate the biological activities of the rhodium(III) coordination complex with polycyclodextrin. The structural characterization was performed by infrared spectroscopy, by which it was possible to observe changes in various vibrational modes of pCD after the formation of the complex; ^1H nuclear magnetic resonance, which confirmed the intermolecular interactions that occurred during the formation of the complex by variations in the chemical shift of the hydrogen signals. Isothermal calorimetric titration showed that the complexation is driven by enthalpy and entropy, with 1:3 stoichiometry. The evaluation of in vitro biological activities was carried out through cytotoxicity and genotoxicity assays, determination of nitric oxide production and evaluation of the expression of the transcription factor NF- κ B and showed that the synthesized complex promoted a decrease in nitric oxide production and NF- κ B expression in macrophage strains RAW 264.7 and J774A.1 maintaining cell viability and without promoting damage to its genetic material. For in vivo evaluation, models of induction of paw edema in mice by inoculation of carrageenan (acute inflammation) and by inoculation of ovalbumin (delayed hypersensitivity) were used. The results showed that rhodium promoted the reduction of paw edema in a similar way to dexamethasone. It was also shown that the

complex promoted the reduction of paw edema, and that this fact is related to the potential of polycyclodextrin to optimize rhodium activity. Further studies should be carried out to evaluate the pathways that are involved in the anti-inflammatory activity of rhodium-based coordination complexes to enable the exploration of their potential.

Keywords: polycyclodextrins, rhodium, immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Componentes da resposta inflamatória	19
Figura 2	Vias de ativação do NF- κ B	21
Figura 3	Diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas e poliméricas	27
Figura 4	Perfil de biodisponibilidade de fármacos convencionais versus sistema de liberação controlada	28
Figura 5	Estruturas moleculares e dimensões de CDs	31
Figura 6	Reações químicas entre β CD e epícloridrina em meio alcalino ..	36
Figura 7	Estrutura esquemática do polímero resultante da reação entre β CD e epícloridrina	36
Figura 8	Ilustração esquemática do efeito cooperativo entre as cavidades de ciclodextrinas	37
Figura 9	Espectros de infravermelho do Rh(III), pCD, MM e Rh(III)/pCD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr	56
Figura 10	Curvas de TGA; DTG e DTA da pCD, RhCl_3 , Rh(III)/pCD e MM...	59
Figura 11	Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da pCD e Rh(III)/pCD em D_2O , 400 MHz	63
Figura 12	Titulação calorimétrica isotérmica do RhCl_3 (60 mM em água) em solução de pCD (4mM em água) a 25 $^\circ\text{C}$	65
Figura 13	Distribuição do tamanho dos agregados de partículas formados em solução aquosa em função da proporção da [Rh(III)]/[pCD]..	67
Figura 14	Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção de [Rh(III)]/[pCD]	69
Figura 15	Formação de micronúcleos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD	78
Figura 16	Formação de micronúcleos em macrófagos da linhagem J774.A1 tratadas com diferentes concentrações de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD	79
Figura 17	Avaliação da inibição da produção de NO pelo Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 h de cultura	82

Figura 18	Avaliação da inibição da produção de NO pelo Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 h de cultura	83
Figura 19	Mediana da intensidade de fluorescência da expressão de NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 3 h de tratamento com Rh(III)/pCD, pCD e Rh(III)	88
Figura 20	Mediana da intensidade de fluorescência da expressão de NF- κ B por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- γ , após 3 h de tratamento com Rh(III)/pCD, pCD e Rh(III)	89
Figura 21	Variação da espessura do edema em patas induzido com carragenina de fêmeas de camundongos BALB/c após 3 h de tratamento intraperitoneal com o Rh(III), pCD, Rh(III)/pCD, dexametasona e com PBS	91
Figura 22	Variação da espessura do edema em patas de camundongos BALB/c após 48 h do desafio com ovalbumina	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos tratamentos para indução do edema de pata com inoculação de carragenina	52
Quadro 2	Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos tratamentos para DTH	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais bandas de FTIR da pCD e Rh(III)/pCD	56
Tabela 2	Atribuições e os valores dos deslocamentos químicos dos sinais de pCD e Rh(III)/pCD referentes aos espectros de RMN de ¹ H	64
Tabela 3	Parâmetros termodinâmicos de interação entre o RhCl ₃ e pCD a 25°C	65
Tabela 4	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em células de adenocarcinoma de pulmão A549 após 48 h de cultivo	71
Tabela 5	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em células de tumor mamário MCF-7 após 48 h de cultivo	71
Tabela 6	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em macrófagos murinos RAW 264.7 após 3 h de cultivo	72
Tabela 7	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em macrófagos murinos RAW 264.7 após 48 h de cultivo	73
Tabela 8	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em macrófagos murinos J774A.1 após 3 h de cultivo	73
Tabela 9	Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 µM, 100 µM e 300 µM em macrófagos murinos J774A.1 após 48 h de cultivo	74
Tabela 10	Valores de IC ₅₀ do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em células J774A.1 e RAW 264.7	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
CD	Ciclodextrina
βCD	Beta ciclodextrina
cm ⁻¹	Número de onda
D ₂ O	Óxido de deutério (água deuterada)
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
D _h	Diâmetro hidrodinâmico
DSL	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Análise térmica diferencial
DTH	<i>Delayed type hypersensitivity</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
IC ₅₀	Concentração que inibe o crescimento celular em 50%
IDN	Índice de divisão nuclear
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina-6
IκB	Inibidor do fator nuclear kappa B
IKK	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B
IKKα	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B alfa
IKKβ	Proteínas quinases do inibidor do fator nuclear kappa B beta
IKKγ	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
LT	Linfotoxina
MHz	Megahertz
MIF	Mediana da intensidade de fluorescência
MM	Mistura mecânica
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio
N	Estequiometria de complexação
NBuds	Brotos nucleares
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i> (Células matadoras naturais)
NIF	Nifedipino
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NPBs	Pontes nucleoplasmáticas
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
Ppm	Partes por milhão
PZ	Potencial Zeta
RANKL	Receptor ativador do ligante NF- κ B
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murinos
Rh Ródio	Rh Ródio
Rh(III)/ pCD	Complexo de coordenação do ródio (III) com pCD
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLC	Sistemas de liberação controlada
TG	Termogravimetria
TGA	Análise termogravimétrica
T _{max}	Temperatura máxima
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>

TLR4	Receptor <i>Toll-like</i> quatro
TNF- α	Fator necrose tumoral – alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
T Δ S	Entropia
USPTO	Escritório de Patentes e Marcas dos EUA
α -CD	Alfa-ciclodextrina
β -CD	Beta-ciclodextrina
γ -CD	Gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO E SEUS MEDIADORES	21
1.2 NANOTECNOLOGIA, NANOMEDICINA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	27
1.3 CICLODEXTRINAS	32
1.4 POLICICLODEXTRINAS	36
1.5 RÓDIO E COMPLEXOS METÁLICOS	40
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 SÍNTESE DA PCD	46
4.2 PURIFICAÇÃO DA PCD	46
4.3 SÍNTESE DO COMPLEXO Rh(III)/PCD	46
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	47
4.4.1 <i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	47
4.4.2 <i>Análises térmicas TGA e DTA</i>	47
4.4.3 <i>Análise de RMN</i>	47
4.4.4 <i>Fotometria de espalhamento de luz dinâmico</i>	48
4.4.5 <i>Determinação do potencial zeta</i>	48
4.4.6 <i>Titulação calorimétrica isotérmica</i>	48
4.5 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM CULTURAS DE CÉLULAS	49
4.5.1 <i>Cultura celular</i>	49
4.5.2 <i>Avaliação do efeito citotóxico do Rh(III), da pCD e do complexo Rh(III)/pCD em células tumorais A549 e MCF-7</i>	49
4.5.3 <i>Avaliação da viabilidade celular em macrófagos tratados com Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD</i>	50
4.5.4 <i>Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e J771.A1 tratados com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD</i>	50
4.5.5 <i>Avaliação da expressão de NF-κB por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD</i>	51

4.5.6 Avaliação da genotoxicidade do Rh(III), da pCD e de Rh(III)/pCD	51
4.6 ENSAIOS IN VIVO.....	53
4.6.1 Indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD	53
4.6.2 Avaliação da hipersensibilidade tardia em camundongos através da inoculação de ovalbumina e o tratamento com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD.....	54
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
6 RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO	57
6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	57
6.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada	57
6.1.2 Análise termogravimétrica, termogravimetria derivada (TGA/DTG) e análise térmica diferencial (DTA)	60
6.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H.....	64
6.1.4 Titulações calorimétrica isotérmicas	66
6.1.5 Fotometria de espalhamento de luz dinâmico e Potencial zeta	68
6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	71
6.2.1 Avaliação do efeito citotóxico do complexo Rh(III)/pCD nas células tumorais A549 e MCF-7.....	71
6.2.2 Avaliação da viabilidade em macrófagos tratados com Rh(III), pCD e Rh(III)pCD.....	73
6.2.3 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na formação de micronúcleos em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1	77
6.2.4 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1	82
6.2.5 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na expressão de NF-κB em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1.....	87
6.2.6 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD em modelo in vivo de indução de edema de pata em camundongos pela inoculação de carragenina.....	91
6.2.7 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD em modelo in vivo de hipersensibilidade tardia em camundongos pela inoculação de ovalbumina	93
7 CONCLUSÕES	96
8 REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

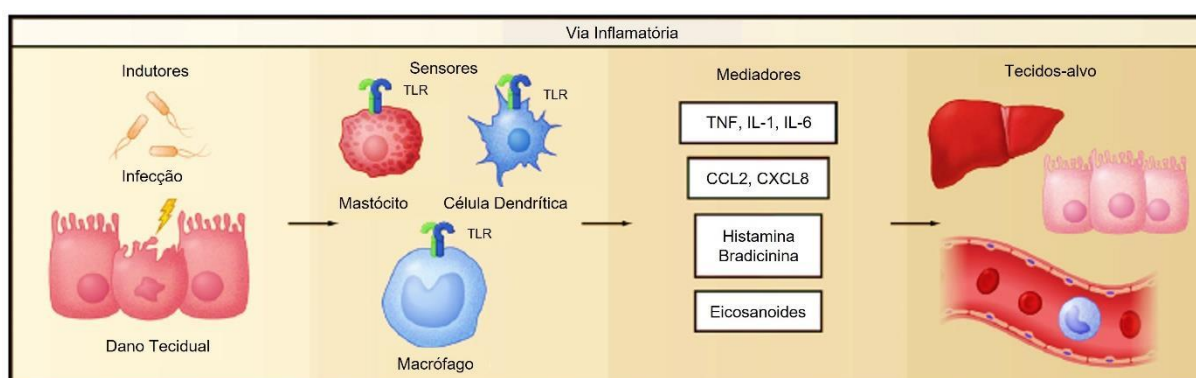
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO E SEUS MEDIADORES

O sistema imunológico, composto por uma variedade de órgãos, células e moléculas, tem por função básica manter a homeostase do organismo. Diante de estímulos infecciosos ou não, como microrganismos, ação mecânica, radiação ionizante, células danificadas ou compostos tóxicos, a primeira resposta do organismo é o desencadeamento de um processo inflamatório, que envolve diversos elementos teciduais, celulares e moleculares (CRUVINEL *et al.*, 2010; NETEA *et al.*, 2017).

Os sinais clínicos característicos do processo inflamatório são rubor, calor, dor, edema e perda de função tecidual. Durante esse processo ocorrem importantes eventos microcirculatórios como aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e acúmulo de leucócitos e a liberação de uma série de mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2018).

Em uma resposta inflamatória típica estão envolvidos quatro componentes básicos que atuam em vias distintas a depender do tipo de estímulo inflamatório, sendo eles: os indutores da inflamação, os sensores que os detectam, os mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e os tecidos-alvo. Independente do estímulo inicial, todos os processos inflamatórios apresentam um mecanismo em comum no qual os receptores de superfície celular reconhecem o estímulo, as vias inflamatórias são ativadas, os marcadores inflamatórios são liberados e as células inflamatórias são recrutadas (NETEA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018). A figura 1 representa um processo inflamatório induzido por um patógeno bacteriano.

Figura 1 - Componentes da resposta inflamatória



Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2010.

Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são estruturas que podem desencadear a resposta inflamatória pela ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos em células imunes como mastócitos, células dendríticas e macrófagos. Os receptores *Toll-like* (TLRs) são os mais bem estudados dentre os PRRs e induzem a produção de mediadores incluindo citocinas, quimiocinas, eicosanoides, entre outros. Citocinas como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), interagindo com TLRs e com os receptores IL-6R, TNFR e IL-1R, atuam mediando o processo inflamatório. A sinalização pelos TLRs promove ainda uma sequência de eventos intracelulares que levam à translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), importante fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (CHEN *et al.*, 2018).

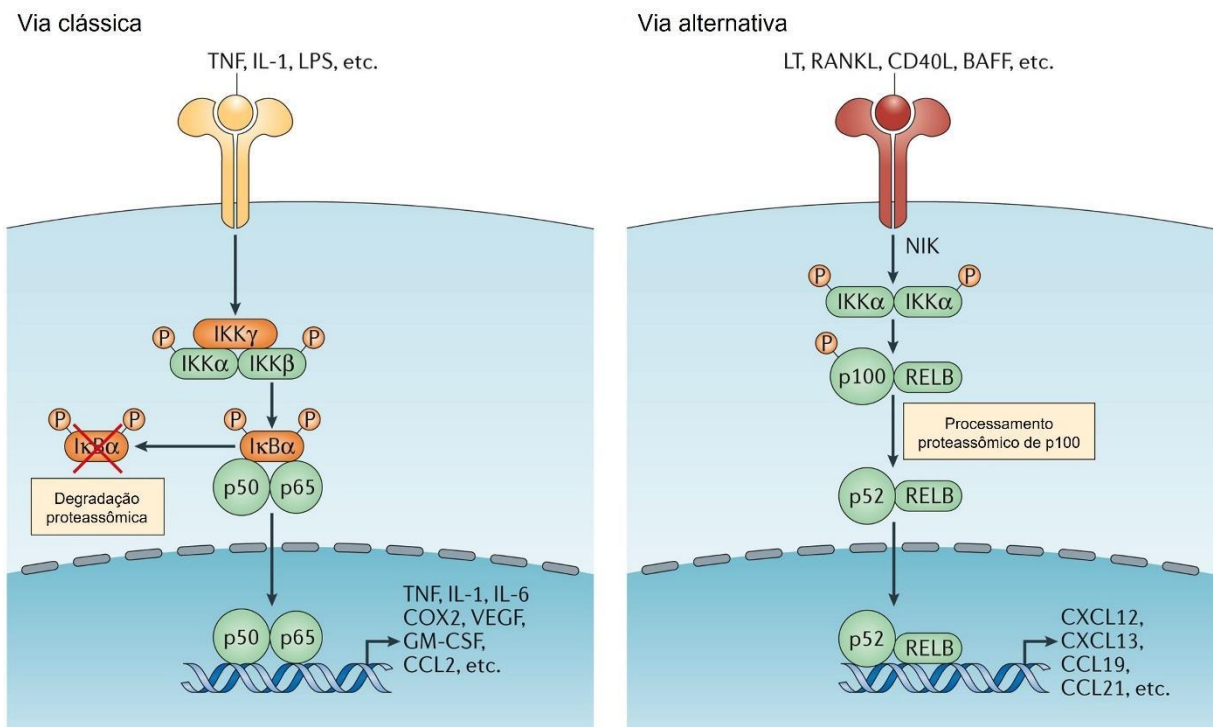
O fator de transcrição NF- κ B regula várias funções das respostas inata e adaptativa, sendo, portanto, um mediador central das respostas imunológicas. Além disso, interfere de forma crítica na ativação, diferenciação e sobrevivência das células imune inatas e células T inflamatórias. Dessa forma, erros na ativação deste fator estão relacionados à patogênese de muitas doenças inflamatórias (LIU *et al.*, 2017).

A família NF- κ B é formada por cinco fatores de transcrição relacionados: p50, p52, p65 (ou RelA), RelB e c-Rel. Eles compartilham um domínio N-terminal de ligação/dimerização ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que permite a formação de homodímeros e heterodímeros, denominado domínio de homologia Rel. Os dímeros se ligam aos sítios κ B, que são sequências específicas de DNA com a finalidade de modular a expressão gênica. Por conter domínios de ativação da transcrição C-terminal, RelB, c-Rel e p65 podem recrutar coativadores e ativar a expressão gênica, ao passo que p50 e p52, que não possuem esses domínios, ativam a transcrição por meio da formação de heterodímeros com os demais fatores ou recrutando outras proteínas que apresentam tal domínio. Quando na condição de homodímeros, p50 e p52 não podem ativar a transcrição, podem reprimi-la ao se ligarem ao DNA (HAYDEN; GHOSH, 2011; LIU *et al.*, 2017).

Os complexos NF- κ B são geralmente encontrados no citoplasma em sua forma inativa complexados a proteínas inibitórias da família I κ B. Essas proteínas ocultam o domínio de ligação dos dímeros NF- κ B/Rel ao DNA e os mantem sequestrados no citoplasma. Além disso, proteínas I- κ B possuem sinais de exportação nuclear capazes de remover as proteínas NF- κ B do núcleo (PANDAY *et al.*, 2016). A ativação do NF-

κB ocorre por duas vias principais de sinalização, a via clássica, ou canônica e a não canônica, também denominada alternativa (Figura 2). A via clássica responde a vários sinais inflamatórios, dentre os quais, lipopolissacarídeo (LPS), TNF-α, PRRs, IL-1 e diversas outras citocinas. Estes estímulos induzem a fosforilação de proteínas I-κB por um complexo de quinases IKK composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ e uma subunidade regulatória IKKγ (também conhecida como NEMO). A fosforilação de IKKα resulta em sua ubiquitinação e degradação. O NF-κB agora ativo se transloca para o núcleo e ativa os genes que codificam citocinas envolvidas na modulação da resposta inflamatória (TANIGUCHI; KARIN, 2018). A via alternativa NF-κB responde a um subconjunto de proteínas pertencentes à família do TNF, incluindo linfotóxina (LT), receptor ativado do ligante NF-κB (RANKL), entre outras, e não envolve a degradação de IκBα (LINGAPPAN, 2018; TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Figura 2 - Vias de ativação do NF-κB



Nature Reviews | Immunology

Fonte: Adaptado de TANIGUCHI; KARIN, 2018.

Além de regular a proliferação, apoptose, morfogênese e diferenciação celular, o NF-κB tem como alvo o aumento da síntese de citocinas inflamatórias (LIU *et al.*, 2017).

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular (em geral de 15 a 30 kDa) predominantemente liberadas pelas células imunes como linfócitos, monócitos e macrófagos. Citocinas anti-inflamatórias atuam com o objetivo de inibir o processo inflamatório, enquanto as pró-inflamatórias promovem a inflamação (CHEN *et al.*, 2018).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória de grande relevância no sistema imunológico por exercer várias funções como induzir a síntese de outras citocinas e mediadores de proliferação e diferenciação celular e apoptose. Esta citocina se apresenta em duas formas: TNF- α solúvel, com 17 kDa e TNF- α ligado à membrana, com 26 kDa, sendo a última forma a mais ativa. A detecção do TNF- α é realizada em situações de infecção e inflamação e seus níveis séricos são proporcionais a gravidade do processo inflamatório. Uma das principais moléculas que estimulam a síntese de TNF- α é o LPS, além de interferon gama (IFN- γ), IL-1, entre outras. Embora células como mastócitos, neutrófilos e linfócitos B sejam capazes de produzir TNF- α , as células T e os macrófagos são considerados os principais produtores desta citocina, que tem suas ações mediadas pela ligação aos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013).

A influência do TNF na regulação de NF- κ B é amplamente apresentada na literatura e existe um crescente interesse em elucidar a atuação do TNF na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que sua ligação ao receptor TNFR1 pode levar à ativação do NF- κ B, bem como induzir a geração de ROS. O esclarecimento desses mecanismos contribui com estudos focados, por exemplo, na criação de novos compostos que atuem na modulação do processo inflamatório (BLASER *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017).

Ainda neste contexto, tão importantes quanto as ROS são as espécies reativas de nitrogênio (RNS), dentre as quais se destaca o óxido nítrico (NO), a menor molécula bioativa conhecida (XUE *et al.*, 2018). A fonte primária de NO é a enzima óxido nítrico sintase (NOS) que possui três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). A iNOS produz NO a partir da L-arginina na presença de oxigênio molecular induzida por LPS e diversas citocinas. O NO desempenha papéis na neurotransmissão, função vascular e tem grande atuação nos processos do sistema imunológico, os efeitos do NO podem variar de acordo com o local e com a quantidade sintetizada. Em condições fisiológicas, em níveis basais, apresenta ação reguladora direta, como na neurotransmissão e vasodilatação. Entretanto, mediante

estímulos inflamatórios, podem ser gerados níveis elevados de NO, o que favorece o desequilíbrio da resposta inflamatória resultando em graves danos teciduais (BOGDAN, 2015; XUE *et al.*, 2018).

Existem estudos que apontam correlação positiva entre produção elevada de NO e citocinas inflamatórias em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, esclerose múltipla e outras doenças (AL-OMRAN; PARVATHY, 2007; SOUFLI *et al.*, 2016; SHARMA; CINELLI *et al.*, 2020). O estresse oxidativo provocado pelo acúmulo de NO leva à peroxidação lipídica, destruição do DNA e oxidação de proteínas, além de promover ligações covalentes com moléculas que induzem a morte celular (JAYAKUMAR *et al.*, 2020)

Tendo em vista os efeitos deletérios do NO em níveis elevados, os inibidores dessa molécula são considerados uma importante ferramenta terapêutica no manejo de doenças inflamatórias. Sharma, Al-Omran e Parvathy (2007) mostram que inibidores seletivos da biossíntese de óxido nítrico e análogos sintéticos de arginina são utilizados para o tratamento da inflamação induzida pelo NO.

Um dos grandes desafios no que se refere ao tratamento das doenças inflamatórias são os efeitos indesejados dos medicamentos anti-inflamatórios atualmente disponíveis. A maior parte das estratégias terapêuticas se baseia na utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e dados recentes mostram que mais de 30 milhões de pessoas fazem uso desses medicamentos diariamente. Não há dúvidas quanto à sua eficácia, entretanto, seus efeitos adversos também são incontestáveis, relacionados, principalmente, aos tecidos cardiovascular, hepático, renal e gastrointestinal (BJARNASON *et al.*, 2018).

Com o foco em minimizar os efeitos deletérios dos tratamentos das doenças inflamatórias, o número de pesquisas para desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas vem crescendo cada vez mais. Em sua revisão, George Psomas (2020) ressalta o papel dos medicamentos à base de metais. Neste trabalho foi relatado que o uso combinatório de metais com drogas e outros compostos biologicamente ativos em condições específicas resulta na suavização de efeitos colaterais, além de melhorias na solubilidade e superação da resistência celular.

Nesse contexto, é de suma importância a elaboração de novos agentes farmacológicos que tenham como alvo a inibição da produção de mediadores inflamatórios com a capacidade de modulá-lo, visando o controle da resposta e evitando o agravamento da condição patológica.

Para avaliar o potencial biológico de novas substâncias existem vários modelos experimentais em animais que induzem inflamação e permitem avaliar, nesse contexto, os efeitos biológicos da substância de interesse. Esses modelos são amplamente utilizados, principalmente o teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, que é amplamente conhecido e apresenta elevado grau de reprodutibilidade (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; FLORENTINO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020). A carragenina é uma substância que estimula a liberação de mediadores inflamatórios e os sinais da inflamação como edema, hiperalgesia e eritema se desenvolvem imediatamente após sua injeção subcutânea (CINELLI *et al.*, 2020). A resposta inflamatória é evidenciada e quantificada pelo edema na pata do animal, a inibição da inflamação induzida pela carragenina é apresentada em vários estudos como preditiva da atividade anti-inflamatória de substâncias de interesse (MORRIS, 2003; CINELLI *et al.*, 2020).

Chandel e colaboradores (2019) sintetizaram pirazolinas à base de cumarina e utilizaram o modelo de inflamação induzida por carragenina para verificar a atividade anti-inflamatória desse composto. Eles constataram que a substância foi capaz de reduzir a inflamação de forma semelhante ao etoricoxibe, medicamento padrão utilizado para fins de comparação.

Com o objetivo de prolongar o efeito terapêutico do fetoprofeno de cálcio desidratado, um fármaco anti-inflamatório não esteroide, Ammar e colaboradores (2017) sintetizaram um complexo do medicamento de referência Nalfosab® com beta ciclodextrinas. O efeito anti-inflamatório das preparações foi avaliado por meio do modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina e os autores chegaram à conclusão de que o complexo formado tem um efeito sustentado em função da liberação mais lenta do medicamento ao longo do tempo devido à formulação com o polímero.

Ao avaliar as propriedades da kukoamina A, um alcaloide bioativo encontrado na raiz da planta *Lycium chinense*, um grupo de pesquisadores da China e da Tailândia constatou que, além de inibir significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, e outros mediadores inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, a substância reduziu a resposta inflamatória *in vivo* no edema da pata induzido por carragenina em camundongos (WANG *et al.*, 2020).

Além dos modelos de edema de pata, a carragenina é utilizada em outros protocolos para induzir a inflamação. Fusco e colaboradores (2017), por exemplo,

induziram a pleurisia (inflamação das pleuras) pela injeção de carragenina na cavidade pleural de camundongos para avaliar o efeito dos agentes bloqueadores do inflamassoma NLRP3, uma via molecular ativada por uma ampla gama de agentes causadores de danos celulares para ativar a resposta imune inata. Ao observar que o tratamento com os agentes testados atenuou o espessamento da membrana pulmonar e a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, reduziu a translocação de NF- κ B no núcleo e inibiu a montagem do complexo NLRP3, eles concluíram que esses bloqueadores podem reduzir significativamente o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por carragenina. Portanto, os estudos presentes na literatura reforçam a relevância dos modelos experimentais que utilizam a carragenina como agente inflamatório tanto para a investigação da fisiopatologia da inflamação aguda, como para a triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório (FLORENTINO *et al.*, 2017; MOON *et al.*, 2018).

Outro modelo experimental *in vivo* amplamente utilizado é o teste de hipersensibilidade do tipo tardia ou *Delayed type hypersensitivity* (DTH). Por meio dele é possível obter vários parâmetros de uma inflamação crônica para diferentes finalidades, como o desenvolvimento de novos fármacos, a exemplo do estudo de Park e colaboradores (2007), que testaram o efeito anti-inflamatório de uma preparação herbal por eles desenvolvida em camundongos com edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Muñoz e colaboradores (2016) utilizaram o teste de DTH para investigar o efeito de nanopartículas de diamante em camundongos com edema de pata induzido por ovalbumina.

O teste de hipersensibilidade do tipo tardia também foi utilizado por Kim e colaboradores (2014) no estudo no qual avaliaram a imunotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco em diferentes tamanhos e cargas elétricas em camundongos.

1.2 NANOTECNOLOGIA, NANOMEDICINA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

A nanotecnologia é definida pela *National Nanotechnology Initiative* (NNI) como a ciência que se baseia em materiais na faixa de 1 a 100 nm de diâmetro e fenômenos que ocorrem com esses materiais (PATRA *et al.*, 2018; AJAYAN, 2019). Esse conceito

é usado por grandes agências federais como *Food and Drug Administration* (FDA) e Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos (USPTO). No entanto, há divergência de alguns especialistas, que afirmam que essa limitação de tamanho é questionável, uma vez que os nanomateriais podem ter propriedades únicas, mesmo em tamanhos que se aproximam dos micrômetros (LAMPRECHT, 2009; VENTOLA, 2012).

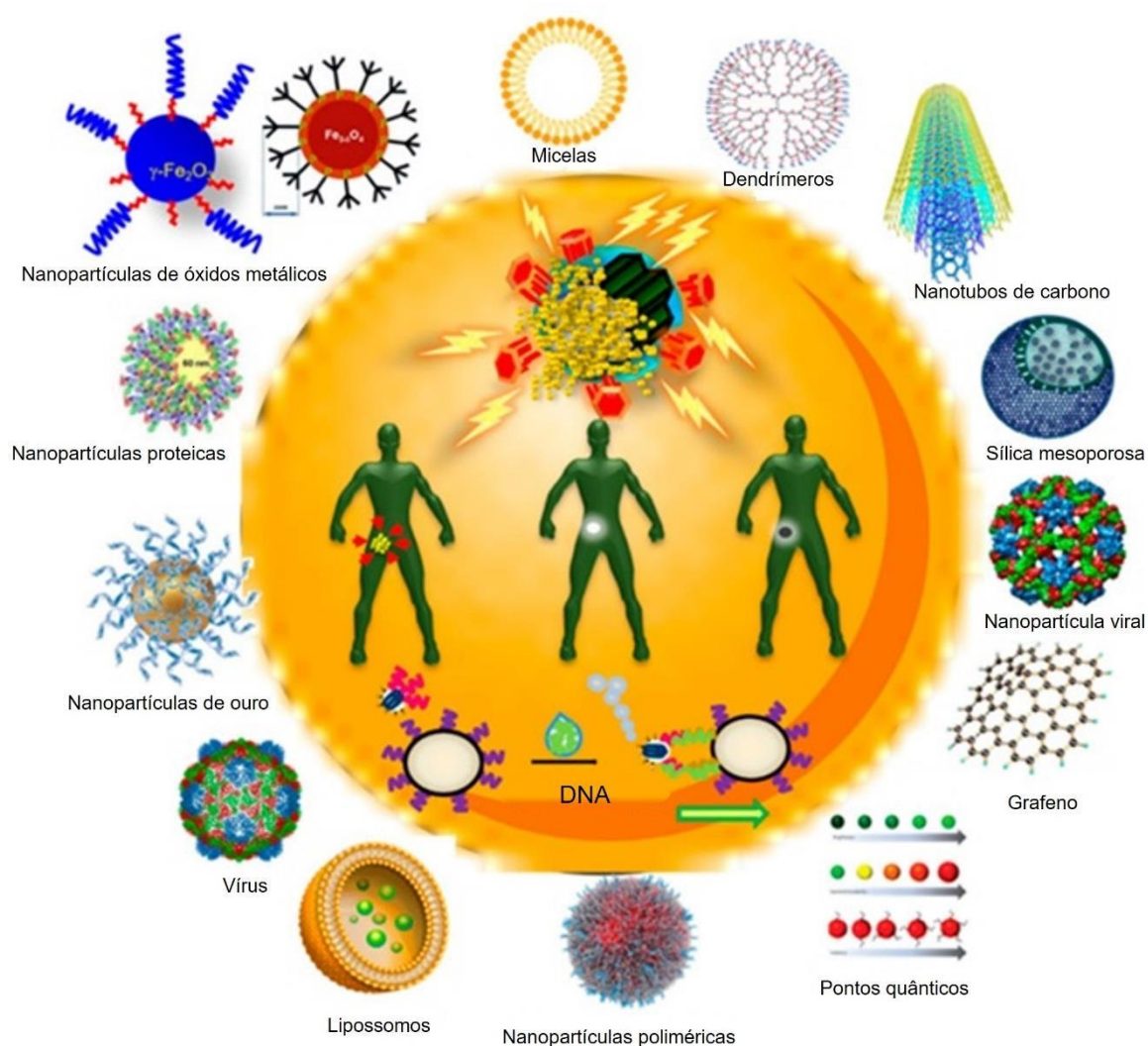
Em escala nanométrica, átomos e moléculas podem apresentar características diferenciadas quanto à capacidade de condutividade elétrica, variações de temperatura, reatividade química, entre outras, o que os torna vantajosos para constituir as nanoestruturas (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2009; TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010). O surgimento das primeiras nanoestruturas data da década de 1950, marcado pelo complexo droga/polímero obtido pelo pesquisador Henry Jatzkewitz, seguido por Bangham e Horne, que, na década seguinte descobriram os lipossomas (ASLAN *et al.*, 2013). Desde então, mais nanoestruturas foram descobertas e seus potenciais mais bem elucidados trazendo grandes avanços e importantes resultados para a ciência. A importância desta área é irrefutável para os cientistas, evidente pelo crescente número de artigos publicados em periódicos nos últimos anos, e para governantes, que em vários países investem em programas no campo da pesquisa e desenvolvimento da nanotecnologia (KARGOZAR; MOZAFARI, 2018; NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES *et al.*, 2020).

Em geral, as características físicas mais importantes das nanoestruturas são composição, tamanho, propriedades de superfície, carga e forma. A grande relação superfície/volume, o tamanho reduzido e a capacidade de encapsular diversos compostos conferem às nanoestruturas muitas vantagens em relação a partículas maiores como maior biodisponibilidade e tempo de circulação (KHAN *et al.*, 2015; TIETJEN *et al.*, 2018). Os tipos disponíveis de nanoestrutura variam conforme sua fonte de origem, como os lipossomas (à base de lipídeos naturais ou sintéticos), nanoestruturas rígidas de polímeros degradáveis ou não-degradáveis, micelas (anfífilas), dendrímeros, nanoestruturas proteicas, virais, de membranas biológicas, derivadas de carbono, de metais e não-metais, com aplicação em diversas áreas como robótica, comunicação, química, engenharia, entre outras (FARAJI; WIPF, 2009; NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019).

Nos últimos anos a nanotecnologia passou a ser amplamente utilizada na área da medicina, dando surgimento à nanomedicina. Com os avanços na ciência dos

materiais, engenharia biomédica, biologia celular e molecular, que contribuem para o aperfeiçoamento constante e por meio da utilização de nanopartículas, a nanotecnologia proporciona grandes progressos no manejo de doenças. Diagnósticos precoces e altamente específicos, tratamentos mais eficazes e com efeitos colaterais reduzidos e reparo a nível tecidual por meio de nanodispositivos são exemplos das aplicações da nanomedicina (JAIN, 2017; WU; WANG; LI, 2020). A figura 3 apresenta os principais tipos de nanopartículas utilizadas em nanomedicina (AGUILERA-CORREA; ESTEBAN; VALLET-REGÍ, 2021).

Figura 3 - Diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas e poliméricas



Fonte: Adaptado de AGUILERA-CORREA; ESTEBAN; VALLET-REGÍ, 2021.

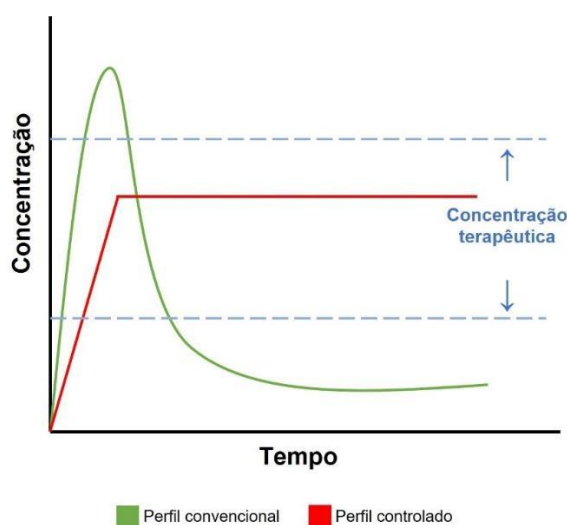
O surgimento da nanomedicina trouxe consigo uma abordagem promissora para contornar problemas da terapia convencional como a falta de especificidade de

muitos medicamentos e os inúmeros efeitos tóxicos decorrentes dos tratamentos atuais. Por isso, dentre as infinitas aplicações possíveis, a utilização de nanoestruturas como agentes de liberação de espécies terapêuticas é uma das que mais vem crescendo e se destacando por meio do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (SLC) (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007; PATRA *et al.*, 2018).

Pode-se definir SLC como dispositivos desenvolvidos com a capacidade de disponibilizar uma quantidade ideal de uma substância de interesse no tecido alvo dentro de um espaço determinado de tempo com o intuito de otimizar a resposta do organismo (KHAN *et al.*, 2015).

A forma como o organismo metaboliza um medicamento, sua biodistribuição, absorção, toxicidade e eliminação estão intimamente ligadas a forma como ele é administrado. As formas tradicionais de administração promovem um aumento da concentração do fármaco na corrente sanguínea até o nível máximo de absorção, mas que não se mantém dentro da faixa terapêutica por um período prolongado e é imediatamente seguido de um declínio, o que resulta na necessidade da administração de uma nova dose para que se aumente novamente a concentração (ASLAN *et al.*, 2013). A figura 4 apresenta a comparação gráfica entre o perfil de concentração do fármaco na terapia convencional e a partir da liberação controlada.

Figura 4 - Perfil de biodisponibilidade de fármacos convencionais versus sistema de liberação controlada



Fonte: adaptada de *Institute for Soldier Nanotechnologies* - *Massachusetts*

Institute of Technology apud ELMAN;
UPADHYAY, 2010.

Oscilações da concentração para fora da faixa terapêutica podem causar problemas como toxicidade, efeitos colaterais em níveis elevados e a ausência do efeito terapêutico desejado, portanto, um SLC ideal, além de direcionar a droga ao local de ação desejado, deve ser capaz de manter a concentração dentro da faixa terapêutica e ainda, induzir mecanismos de ação alternativos. Para isso, a escolha dos materiais utilizados no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada representa um papel crítico, eles devem ser biocompatíveis, quimicamente estáveis, não tóxicos, não imunogênicos e devem ser facilmente sintetizados (JAIN, 2017).

Para serem considerados não tóxicos, os materiais precisam ser avaliados, entre outros aspectos, quanto ao seu potencial genotóxico, ou seja, sua capacidade de promover qualquer tipo de dano ao DNA, cromossomos ou material nuclear das células (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020). Uma vez que mutações em células somáticas e germinativas podem ter consequências que variam desde o desenvolvimento de um câncer até o comprometimento da reprodução e o nível populacional, é de suma importância a investigação deste parâmetro (UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2016). Atualmente estão disponíveis muitos tipos de testes *in vivo* e *in vitro* que permitem avaliar o efeito genotóxico de novos produtos farmacêuticos, dentre os quais se destaca o ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2016; SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

Existem diferentes formas de se modificar a liberação de fármacos, cada uma delas com suas características próprias. Na liberação retardada uma única formulação com repetidas dosagens é utilizada e a liberação do medicamento acontece em um momento diferente daquele imediatamente após a administração. Já a liberação sustentada disponibiliza o medicamento por um período prolongado após a administração e, finalmente, a liberação controlada propriamente dita se refere ao mecanismo que direciona o medicamento para os locais específicos e os mantém na concentração efetiva (SINGHVI; SINGH, 2011; LEE; YEO, 2015).

Os principais mecanismos de liberação controlada frequentemente empregam moléculas como lipossomas, dendrímeros, diferentes nanopartículas poliméricas e ciclodextrinas (RANI *et al.*, 2019). Os lipossomas foram as primeiras nanoestruturas estudadas como carreadores de drogas terapêuticas. São vesículas formadas por

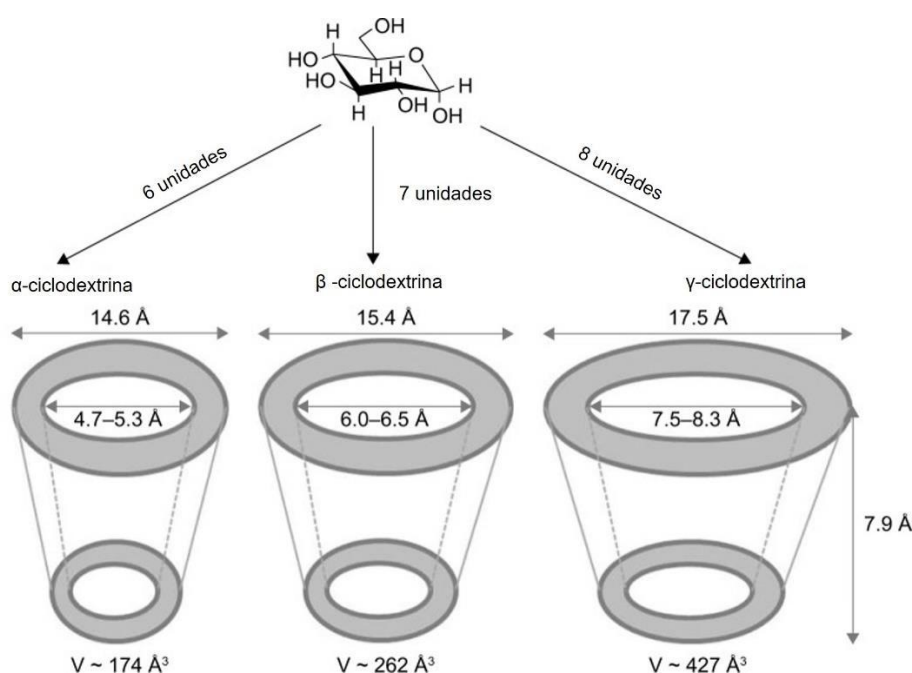
bicamadas lipídicas nas quais os fármacos solúveis em água podem ser encapsulados. Os dendrímeros são polímeros naturais ou sintéticos ramificados que possuem um núcleo central. A superfície dessas moléculas apresenta numerosas cadeias que podem ser modificadas quimicamente. Os fármacos podem se ligar covalentemente aos grupos terminais de um dendrímero ou podem ser aprisionadas dentro do núcleo por meio de ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou interações eletrostáticas (LEE; YEO, 2015; RANI *et al.*, 2019). As nanopartículas poliméricas podem se apresentar como nanocápsulas ou nanoesferas, diferindo entre si segundo sua constituição e organização estrutural. As nanocápsulas possuem um núcleo apolar com um invólucro polimérico ao seu redor – os fármacos podem estar adsorvidos à superfície polimérica ou dissolvidos no núcleo. Ao contrário das nanocápsulas, as nanoesferas não possuem núcleo hidrofóbico em sua composição, sendo constituídas por uma matriz polimérica na qual o fármaco pode ser adsorvido ou retido (TELI; MUTALIK; RAJANIKANT, 2010). As ciclodextrinas se destacam por sua excelente biocompatibilidade e capacidade de formar complexos de inclusão. Ao longo dos últimos anos vem crescendo o número de pesquisas que exploram essas características para aplicá-las no desenvolvimento de sistemas supramoleculares para distribuição de fármacos (ZHANG; MA, 2013; JACOB; NAIR, 2018; SHELLEY; BABU, 2018). Para desenvolver mecanismos de liberação controlada à base de ciclodextrinas é fundamental conhecê-la detalhadamente, dessa forma, a seguir serão apresentadas e discutidas suas principais características.

1.3 CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos resultantes da degradação de amido ou derivados de amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase, presente em alguns tipos de microrganismos. Os tipos mais comuns, conhecidos como α , β , e γ -ciclodextrinas, apresentam-se, respectivamente, com seis, sete e oito unidades de glucopiranosose unidas por ligação α -(1-4) (Fig. 5). β -ciclodextrinas (β CD) representam o equivalente a 70% do total de CDs, ao passo que 15% são de α -ciclodextrinas (α CD), 5% γ -ciclodextrinas (γ CD) e os 10% restantes são compostos de outros derivados de CDs (LI *et al.*, 2007; LANNA *et al.*, 2016; OLIVERI; VECCHIO, 2018).

As CDs não são totalmente cilíndricas, possuem o aspecto de um cone truncado com cavidade côncava oca medindo em média 7,9 Å de profundidade. Os diâmetros superior e inferior variam em função do número de unidades de glicose (ZHANG; MA, 2013; MOCANU; VIZITIU; CARPOV, 2001; PROCHOWICZ *et al.*, 2016). Cada um dos tipos de ciclodextrinas apresenta diferentes características de solvatação, a β CD é a espécie com menor solubilidade (18,5 g/L), seguida da α CD (145,0 g/L) e da γ CD (232,0 g/L) a 25 °C (LI *et al.*, 2007; JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

Figura 5 - Estruturas moleculares e dimensões de CDs: α CD, β CD e γ CD



Fonte: Adaptado de RAMOS *et al.*, 2018.

Os custos relacionados aos tipos de CD diminuem de acordo com a facilidade de isolar e purificar cada um. Um frasco com 100 g de β CD é vendido, em média, por R\$ 1.991,00 pela empresa *Sigma Aldrich*, enquanto 25 g de α CD custam R\$ 3.215,00 e 5 g de γ CD a R\$ 12.571,00 (QIU *et al.*, 2018; SIGMA, 2022).

Há uma variedade de vias sintéticas que permitem alterar quimicamente as ciclodextrinas para sintetizar produtos de grande relevância e interesse tecnológico e uma dessas ferramentas é a substituição dos hidrogênios das hidroxilas OH6 por grupos sulfobutila, hidroxipropila e metila. As hidroxilas encontram-se em uma disposição que permite formar ligações intramoleculares de hidrogênio – as hidroxilas OH2 de uma unidade interagem com as hidroxilas OH3 da unidade subsequente.

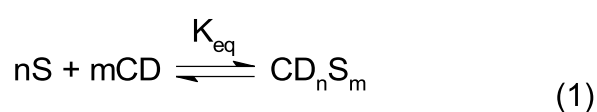
Tomando como exemplo a β CD, observa-se que o número de unidades glicosídicas no anel permite que as hidroxilas estejam posicionadas a uma distância propícia para que todas elas estejam envolvidas em uma corrente de ligações de hidrogênio dentro da molécula (SWARBRICK, 2007; QIU; LI; LIU, 2017).

As ciclodextrinas podem ser consideradas moléculas anfifílicas, uma vez que apresentam duas regiões com diferentes comportamentos: sua parte externa, onde estão presentes as hidroxilas, tem caráter hidrofílico; em contrapartida, a parte interna se mostra hidrofóbica, o que desfavorece a presença de moléculas iônicas ou polares (LULA *et al.*, 2011; ZHANG; MA, 2013).

Tem sido extensivamente demonstrado que as ciclodextrinas podem formar complexos com diversos compostos orgânicos e inorgânicos. O caráter hidrofóbico das moléculas de CD permite a formação reversível de complexos com elementos como íons, proteínas, oligonucleotídeos, entre outros (NAMGUNG *et al.*, 2014; PROCHOWICZ *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017). Acredita-se que a utilização de ciclodextrinas em formulações de fármacos seja a mais relevante de suas aplicações, podendo promover aumento da solubilidade, estabilidade e disponibilidade, além de reduzir a sua toxicidade em sistemas biológicos sem alterar as propriedades físicas, químicas e biológicas dos mesmos (JAMBHEKAR; BREEN, 2016b).

Durante a formação dos complexos são estabelecidos vários tipos de ligações intermoleculares. As moléculas de água são de grande importância para a complexação – nesse processo, tais moléculas, então localizadas na cavidade central das ciclodextrinas, são substituídas por moléculas ou grupos de moléculas-hóspede que apresentam compatibilidade quanto a polaridade, forma, tamanho e estrutura das CDs. Isso acontece como consequência do estado de alta energia e baixa entropia dessas moléculas de água na presença de um terceiro componente que possua polaridade menor que a da água (SWARBRICK, 2007).

Para descrever tal fenômeno em termos de equilíbrio químico de maneira resumida é utilizada a equação:



onde S é o substrato (orgânico ou inorgânico) hospede, CD é a ciclodextrina, CD_nS_m é o composto de inclusão, m e n são os coeficientes estequiométricos da reação e K_{eq} é a constante de equilíbrio do processo, em que o número de moléculas de água envolvidas pode ou não estar explícito (BUSTOS *et al.*, 2008; JAMBHEKAR; BREEN, 2016b).

A complexação de drogas com CDs é um processo rapidamente reversível. Em solução aquosa tais complexos são continuamente formados e dissociados com a vida útil muito curta, cerca de milissegundos ou menos (SWARBRICK, 2007). Além de melhor solubilidade, os complexos se mostram ainda com melhor capacidade de dissolução quando comparados a formulações tradicionais de fármacos. Os complexos podem ser formados por inclusão completa do fármaco ou com apenas parte dele, sendo que, frequentemente, a proporção “*host-guest*” é de 1:1. Em solução aquosa, há um equilíbrio dinâmico entre as moléculas livres de CDs e de fármacos e os complexos formados, e a dissociação dos complexos é governada pelo equilíbrio termodinâmico, geralmente no sentido de maior entropia, ou seja, das moléculas separadas (KOOPMANS; RITTER, 2008; QIU; LI; LIU, 2017).

Para que um fármaco administrado por via oral seja absorvido é necessário que haja dissolução e transposição da membrana intestinal. Apenas as formas livres dos fármacos são capazes de atravessar as barreiras lipofílicas, portanto, ocorrerá a precipitação do fármaco livre que apresenta baixa solubilidade se sua concentração na solução for superior ao equilíbrio de solubilidade (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; MRÓWCZYŃSKI *et al.*, 2018).

A baixa solubilidade aquosa, a estabilidade *in vivo* reduzida e a degradação no ambiente gastrointestinal são condições que têm motivado a pesquisa para desenvolvimento de complexos com ciclodextrinas. Por exemplo, foi evidenciado aumento da solubilidade, da taxa de dissolução, biodisponibilidade e atividade antitumoral de diversas drogas como o metotrexato (BOURKAIB *et al.*, 2013), a cisplatina (SWARBRICK, 2007) e a doxorrubicina (JACOB; NAIR, 2018) utilizadas no tratamento de câncer de mama, de pele, testicular, ovariano e leucemia quando complexados com a ciclodextrina. A melhora na solubilidade proporcionada pela complexação com CDs pode variar de acordo com as características de cada fármaco (QIU; LI; LIU, 2017; TIAN; HUA; LIU, 2020).

Embora sejam muitos os benefícios proporcionados pela formação dos complexos, é válido ressaltar que as ciclodextrinas nativas são incapazes de

incorporar algumas moléculas grandes, e ainda que os compostos de inclusão com CDs, em formulações complexas, podem se dissociar muito facilmente devido à competição com outras espécies químicas presentes no meio. No intuito de contornar tal problema, em especial em formulações de elevada viscosidade como pomadas, pastas, cremes, géis e loções, nas quais, em geral, são necessários vários componentes espessantes, tem sido dada atenção aos sistemas formados por polímeros de ciclodextrinas (CHAI *et al.*, 2014; PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWIŃSKI, 2017).

1.4 POLICICLODEXTRINAS

A polimerização de ciclodextrinas, que dá origem à policiclodextrina (pCD), constitui uma estratégia para ampliar a capacidade de inclusão, permitindo a complexação de moléculas maiores do que aquelas incorporadas nos complexos com as ciclodextrinas nativas e fornecendo efeito espessante à formulação (PRATT *et al.*, 2010; GIDWANI; VYAS, 2014).

Dentre as diferentes formas de produção das pCDs com a utilização de agentes reticulantes como dianidridos orgânicos e compostos carbonílicos, a reação com a epicloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano) é a mais frequente na química de polissacarídeos. Epicloridrina (Epi) é um agente bifuncional que contém dois grupos funcionais reativos - um grupo cloroalquila e um epóxido - que lhe permitem formar ligações com as hidroxilas da β CD (etapa de reticulação) e/ou com ele mesmo (etapa de polimerização) (HEYDARI *et al.*, 2018). Pesquisadores do grupo suíço Jürg Solms foram os primeiros a publicar, em 1964-65, uma patente de seu estudo sobre materiais de ciclodextrinas reticuladas com epicloridrina - o primeiro a identificar e explorar o papel das cavidades das CDs nos materiais reticulados com Epi e a introduzir a noção de complexos de inclusão e de associação desses materiais. Os primeiros relatos da utilização desses materiais formando complexos com fármacos datam do final da década de 1990. Até a década de 1970 as principais aplicações desses materiais eram na indústria alimentícia para separar vitaminas, ácidos nucleicos e proteínas por meio da cromatografia líquida de baixa pressão (CRINI, 2014).

A utilização da Epi para a modificação de CDs vem sendo cada vez mais notificada ao longo das últimas décadas com diferentes finalidades. Koopmans e colaboradores (2008) apresentaram aumento da viscosidade dos hidrogéis

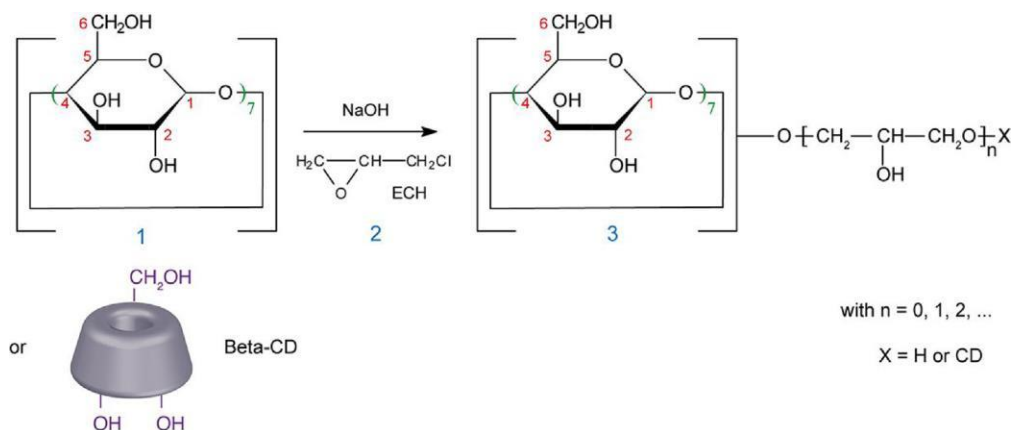
produzidos com pCD e observaram que a variação na quantidade de agentes reticulantes exerce influência sobre o produto – de acordo com os autores, a formação de um hidrogel com elevada viscosidade só pode ser obtida com altas concentrações de epícloridrina. Gidwani, Vyas e Deep Kaur (2018) analisaram o comportamento de inclusão do agente anticâncer gefitinibe em um polímero de pCD e, através de diferentes técnicas analíticas, demonstraram modificações nas propriedades físico-químicas do composto. Seus resultados atestam que, quando complexada, a droga é convertida de um estado cristalino para uma condição amorfa, com maior potencial de dissolução quando comparada à sua forma cristalina.

Nangung e colaboradores (2014) desenvolveram um complexo entre pCD e o agente antitumoral paclitaxel e mostraram que o complexo apresentou não apenas boa dispersibilidade em água, mas também elevada estabilidade no sangue devido a interações multivalentes. O mesmo estudo evidenciou ainda que é eficientemente absorvido pelas células cancerosas alvo através de mecanismos passivos e ativos. A eficiência do sistema de distribuição baseado em policiclodextrinas pode variar em função do tipo de droga a ser transportada devido às interações complexas entre os diferentes agentes utilizados e a pCD.

Um estudo desenvolvido na Índia por Bina Gidwani e Amber Vyas (2014), no qual foi sintetizado um complexo entre pDC e glipizida, um fármaco hipoglicemiante utilizado em pacientes diabéticos, apresentou um aumento da solubilidade aquosa e da taxa de dissolução desse fármaco.

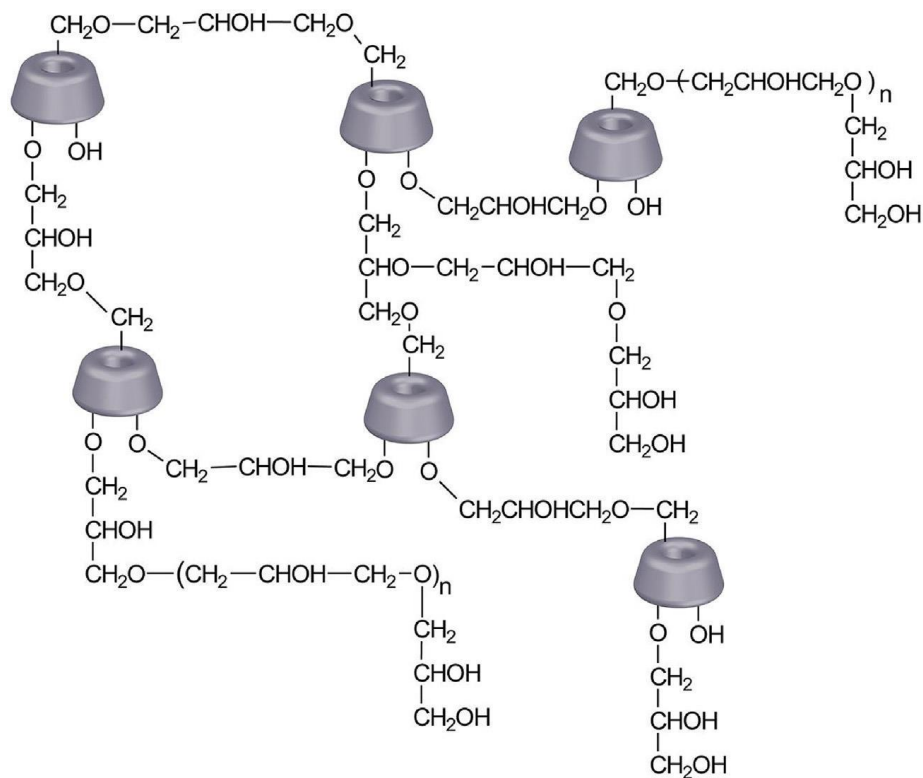
Uma das maneiras de sintetizar policiclodextrina com o uso de epícloridrina é por meio de condensação e polimerização em uma única etapa - a reação é geralmente preparada com β CD na presença de Epi em meio alcalino, resultando em produtos que contêm misturas de espécies poliméricas de diferentes pesos moleculares (KOOPMANS; RITTER, 2008). A reação e a estrutura esquemática do polímero formado estão representadas nas figuras 6 e 7.

Figura 6 - Reações químicas entre β CD e epiclorigrina em meio alcalino



FONTE: (MORIN-CRINI *et al.*, 2018).

Figura 7 - Estrutura esquemática do polímero resultante da reação entre β CD e epiclorigrina

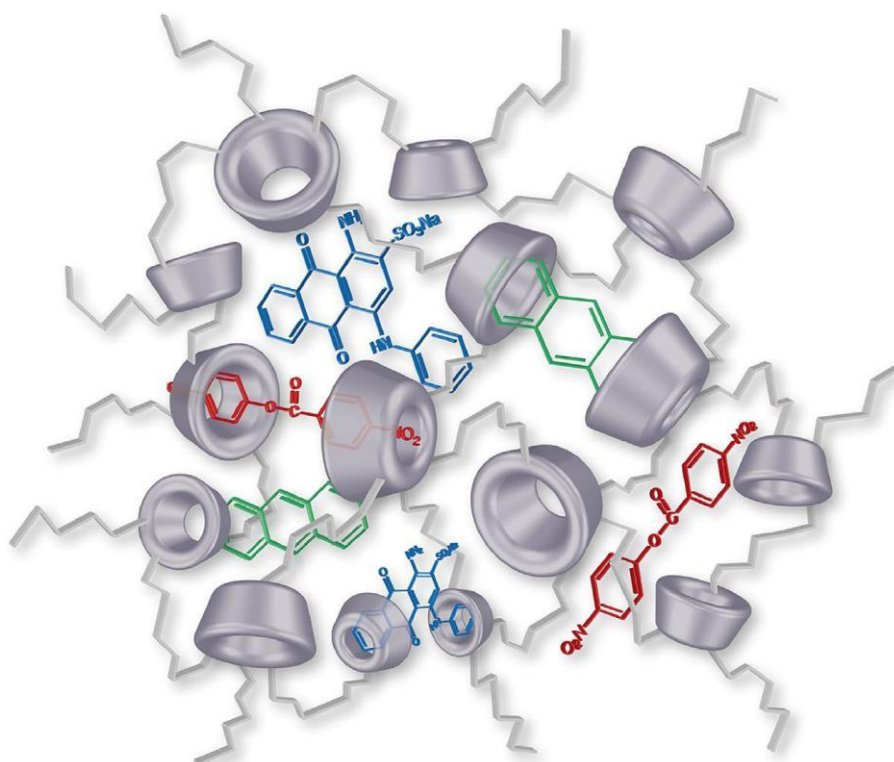


FONTE: (MORIN-CRINI *et al.*, 2018).

Uma vez sintetizada, a pCD apresenta a capacidade de hospedar e reconhecer diversos substratos. A estequiometria do complexo formado frequentemente é de 1:1, ou seja, com a inclusão de uma única molécula hóspede para cada cavidade, entretanto, essa proporção não é uma regra, também podem ser observadas razões estequiométricas de 2:1, 2:2, 3:1, 3:2 ou 4:5 (PROCHOWICZ; KORNOWICZ; LEWIŃSKI, 2017; OLIVERI; VECCHIO, 2018).

De modo geral os complexos podem ocorrer em duas formas distintas: complexos de inclusão, quando a molécula hóspede é completamente incorporada e complexos de associação, nos quais a molécula hóspede está parcialmente incluída. Além dessas duas formas, existem ainda os complexos formados por efeito de cooperação não apenas entre cavidades, mas também entre as cavidades das ciclodextrinas e a rede polimérica, como ilustrado na figura 8 (MORIN-CRINI *et al.*, 2018).

Figura 8 - Ilustração esquemática do efeito cooperativo entre as cavidades de ciclodextrinas



FONTE: (MORIN-CRINI *et al.*, 2018).

As características únicas das policiclodextrinas apresentadas e os resultados dos inúmeros estudos que exploram suas funcionalidades deixam clara sua superioridade em relação às ciclodextrinas nativas em determinadas aplicações, e que

elas podem ser utilizadas como importante recurso em aplicações biomédicas e farmacêuticas.

1.5 RÓDIO E COMPLEXOS METÁLICOS

Complexos metálicos podem apresentar grandes vantagens quando comparados aos complexos à base de compostos convencionais como o carbono. Seus estados oxidativos, suas propriedades eletrônicas e sua capacidade de organizar diferentes ligantes ao redor do centro do metal de forma estável os transformam em alternativas viáveis às moléculas orgânicas como agentes terapêuticos (LIU *et al.*, 2014).

Os complexos à base de platina vêm sendo estudados há muitos anos. Em 1979 a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina se tornou um marco no campo da pesquisa da química inorgânica com foco em agentes quimioterápicos (MA *et al.*, 2016). Apesar do sucesso alcançado, foram observados muitos efeitos colaterais como resistência de algumas células e elevada toxicidade, o que impulsionou os pesquisadores a explorarem complexos com outros elementos metálicos (KATSAROS; ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

O ródio (Rh) é um dos elementos metálicos que compõem o grupo da platina juntamente com rutênio (Ru), paládio (Pd), ósmio (Os), irídio (Ir) e a platina (Pt), todos eles possuem propriedades físicas e químicas similares e tendem a ocorrer juntos nos mesmos depósitos minerais. O ródio pertence ao grupo 9 da tabela periódica, é um metal de transição com massa molar de 102,9 g/mol, número atômico 45, distribuição eletrônica d^8s^1 , sua densidade é de 12,4 g/cm³ a 20 °C. Seu ponto de fusão é aproximadamente 1964 °C e o de ebulição 3995 °C. É um metal relativamente inativo, não é atacado por ácidos fortes. Os principais estados de oxidação do ródio são +3 e +1, embora podem, ocasionalmente, ser encontrados nos estados de valência +1, +2, +4 e +6, com complexos +3 dominante em solução de cloreto (LIVINGSTONE, 1975; BENGUEREL; DEMOPOULOS; HARRIS, 1996; ALVES; SILVA; GUERRA, 2010).

Os complexos de Rh(I) são bastante numerosos, os complexos $[Rh(CO)_2L]$, onde L são derivados de sulfonamida ou ditiocarbamato e derivados de xantato, foram atestados por Craciunescu e colaboradores (1989) como agentes citostáticos e antitumorais.

O trabalho de Stringer e colegas apresentou complexos heterometálicos de Rh(I) e salicilaldiminas com potencial antimalárico (STRINGER *et al.*, 2015).

Os carboxilatos de ródio (II) $[Rh_2(O_2CR)_4]$ foram descobertos em 1960 por Chernyaev e colaboradores e, desde então, vem sendo extensivamente estudados - compreendem a maior classe de compostos de ródio (II) conhecida (DUBICKI; MARTIN, 1970). A pesquisa voltada para essa classe de compostos viabilizou, na década de 1970, a descoberta da sua atividade antitumoral. Foi demonstrado que os carboxilatos de ródio (II) são capazes de interagir com o DNA e inibir processos da replicação (CHIFOTIDES *et al.*, 2003).

A atividade antitumoral promissora dos carboxilatos de ródio já foi observada também em linhagens celulares resistentes à cisplatina, com atividade citostática em tumores L1210, carcinoma ascítico de Ehrlich, melanoma B16 e sarcomas 180 e P388 (CARNEIRO *et al.*, 2013).

O interesse pelo ródio como um potencial agente antitumoral existe desde a década de 1970 e os complexos de ródio III são as espécies organometálicas mais bem-sucedidas nos estudos voltados para essa finalidade (GIL; KUBOTA; NAJJAR, 1998; MEDICI *et al.*, 2015; BOYLE; BARTON, 2018). Entretanto, esses complexos apresentam grande potencial em diversas outras atividades biológicas com vários alvos incluindo enzimas, interações proteína-proteína e mediadores inflamatórios.

Ma e colaboradores (2016) apresentaram complexos de ródio III com capacidade inibitória da atividade da proteína beta amiloide, envolvida na progressão da doença de Alzheimer, sugerindo esses complexos como ferramentas no manejo terapêutico dessa doença.

A *Royal Society of Chemistry* publicou em 2017 testes com atividades biológicas de dois complexos de coordenação de Rh(III): $[Rh(ed3a)(OH_2)] \cdot H_2O$ e $Na[Rh(ed3a)Cl] \cdot H_2O$ em quatro linhagens de células tumorais humanas (MCF-7, A549, HT-29 e HeLa) e uma não tumoral (MRC-5). Nas análises de citotoxicidade os autores observaram que todas as células tumorais, exceto MCF-7 foram sensíveis a ambos os complexos. Além disso, por meio de análise molecular de proteínas, evidenciaram que ambos os complexos induziram a redução da quantidade de Bcl-2, uma proteína crucial nos processos apoptóticos (JEREMIĆ *et al.*, 2017).

Corroborando com outros estudos que apontaram complexos cineticamente inertes de ródio como inibidores de proteínas quinases ou como moduladores de interações proteína-proteína, Zhong e colaboradores desenvolveram em 2014 um

complexo de Rh(III) e mTor recombinante pré incubado com a proteína FKBP12. Em seus resultados constataram que este complexo atenuou a atividade de mTOR, uma proteína com papel central no crescimento, na proliferação e na manutenção das células, tanto em um sistema livre de células quanto em imunoprecipitados de células tratadas (ZHONG *et al.*, 2014).

Além das atividades acima citadas, estudos apresentam efeitos imunomoduladores de diferentes complexos de ródio. Estão presentes na literatura relatos de complexo ciclometalado de Rh(III) inibindo a atividade da enzima NAE, envolvida na regulação dos processos de doenças inflamatórias e intestinais (ZHONG *et al.*, 2017), de NF- κ B, também envolvido em inúmeros processos inflamatórios e ainda efeitos anti angiogênicos em modelos experimentais (LIU *et al.*, 2014).

Em doenças inflamatórias a família de histonas demetilases JMJD3 é responsável por desmetilar especificamente a lisina 27 na histona H3 (H3K27me3), uma marca epigenética repressiva, modulando, portanto, a expressão de genes alvo. Uma das formas de indução da expressão de JMJD3 é por meio de estímulos pró-inflamatórios. Com base nesses mecanismos Kang e colaboradores (2018) sintetizaram o primeiro complexo metálicos seletivo à base de Rh(III) e ao investigar seus efeitos biológicos constataram que o complexo se comporta como antagonista da atividade de JMJD3. O complexo inibiu seletivamente a desmetilação de H3K27me3 e promoveu também a inibição da produção de TNF- α em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.

Os inúmeros estudos que demonstram o potencial bioativo dos metais de transição, especialmente do ródio e seus complexos, em diferentes áreas impulsionam o desenvolvimento de novos complexos de ródio para investigar seu potencial imunomodulador. Diante do exposto é possível dizer que a policiclodextrina é uma molécula promissora capaz de formar um complexo de coordenação macromolecular com o Rh(III) e acentuar sua atividade biológica por meio da melhora da sua biodisponibilidade.

2 JUSTIFICATIVA

O tratamento das doenças inflamatórias enfrenta grandes desafios relacionados aos anti-inflamatórios atualmente disponíveis. A maior parte das estratégias terapêuticas se baseia na utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais e milhões de pessoas fazem uso diário destes medicamentos, que apesar de eficazes, apresentam inúmeros efeitos indesejáveis.

A utilização de nanoestruturas como agentes de liberação controlada de espécies terapêuticas tem sido uma excelente estratégia para tentar minimizar este problema. Embora o cenário farmacêutico atual venha evidenciando o potencial das ciclodextrinas em oferecer melhorias às propriedades terapêuticas de muitas drogas, a solubilidade aquosa é um fator limitante para que muitos fármacos sejam utilizados como ferramentas para os sistemas de liberação controlada. Na tentativa de contornar essa questão, alguns estudos desenvolvidos ao longo dos últimos anos têm voltado o foco para a modificação da estrutura química dessas moléculas.

As ciclodextrinas polimerizadas apresentam vantagens em algumas situações em relação às demais ciclodextrinas, por combinarem as características vantajosas dos polímeros, garantindo solubilidade, além da capacidade de formação de complexos como as demais ciclodextrinas.

Nesse contexto, as pesquisas biomédicas e farmacêuticas vêm crescendo a cada dia na tentativa de explorar o potencial das policiclodextrinas como ferramentas multifuncionais que permitem melhorar os sistemas de liberação controlada de compostos bioativos e proporcionar avanços no desenvolvimento de medicamentos e na eficiência terapêutica.

Existe uma infinidade de compostos bioativos atualmente estudados, dentre eles, os metais do grupo da platina, como o ródio, que possuem conhecida atividade antitumoral. No entanto, ainda são escassos os estudos acerca do seu potencial imunomodulador.

Isto posto, torna-se de grande relevância desenvolver novos compostos com policiclodextrinas e explorar suas atividades em sistemas biológicos com o intuito de aperfeiçoar as formulações atualmente disponíveis aumentando a disponibilidade e reduzindo a toxicidade de compostos bioativos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar o complexo de Rh(III) com policiclodextrinas e investigar seu efeito biológico *in vitro* em linhagens de macrófagos e *in vivo* em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o complexo Rh(III)/pCD;
- Avaliar as interações intermoleculares entre o ródio (III) e a policiclodextrina no estado sólido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR);
- Avaliar a estabilidade térmica do complexo de coordenação através de análise termogravimétrica (TGA), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA);
- Avaliar as interações intermoleculares entre o ródio (III) e a policiclodextrina em solução aquosa por ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H);
- Avaliar, por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (PZ), a estrutura supramolecular do complexo;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de complexação (variação de entalpia: $\Delta_r H^\circ$, variação de entropia: $T\Delta_r S^\circ$, variação de energia livre de Gibbs: $\Delta_r G^\circ$ e constante de equilíbrio: K_{eq}), através da titulação calorimétrica isotérmica (ITC);
- Verificar o efeito citotóxico nas linhagens de células tumorais A549 e MCF7 após tratamento com Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD;
- Verificar a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD;
- Investigar a genotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh(III), pCD e do complexo Rh(III)/pCD;
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh (III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD;
- Avaliar a expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh (III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD;

- Avaliar os efeitos no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos BALB/c tratados com Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD;
- Avaliar os efeitos no edema de pata induzido por ovalbumina em camundongos BALB/c tratados com Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD por meio do ensaio de DTH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DA pCD

As pCDs foram sintetizadas por reação de polimerização da β CD na presença de vinculador químico, a epícloridrina, em meio básico ($[\text{NaOH}] = 5 \text{ M}$) sob agitação (1000 s^{-1}) e temperatura ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) controladas no copo metálico do Reômetro Dinâmico Híbrido DHR1, o qual foi utilizado como reator.

Durante a síntese, houve coleta e armazenamento dos dados de viscosidade pelo software TRIOS, que por sua vez foram transferidos para o programa Microcal Origin 9.0 para modelagem matemática e determinação da cinética de reação.

4.2 PURIFICAÇÃO DA pCD

Após a síntese, a pCD foi purificada por precipitação em acetona. O sólido obtido foi seco, redissolvido em água, neutralizado com HCl até $\text{pH} \approx 7$ e novamente precipitado em acetona (RENARD *et al.*, 1997).

4.3 SÍNTESE DO COMPLEXO Rh(III)/pCD

O complexo de Rh(III)/pCD foi formado espontaneamente pela reação da pCD com o cloreto de ródio após mistura na proporção molar 1:1 (vide experimentos de ITC na sessão 4.4.6). Para a síntese foram preparados 20 mL de solução aquosa de RhCl_3 hexahidratado na concentração 5 mM e 20 mL de solução aquosa de pCD também na concentração 5 mM (considerando a massa molar do monômero de β CD). As soluções foram misturadas e mantidas sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. Em seguida o material foi congelado e posteriormente seco por meio de liofilização durante 24 h.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) dos compostos puros (cloreto de ródio e pCD) e do complexo Rh(III)/pCD foram adquiridos em um equipamento da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM, a partir de pastilhas contendo KBr. Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA) para edição.

4.4.2 Análises térmicas TGA e DTA

Por meio de termogravimetria (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foi investigado o comportamento térmico da pCD sintetizada bem como do seu complexo com ródio, uma vez que essas técnicas permitem monitorar, respectivamente, a massa e a capacidade calorífica do material em função da temperatura. Desse modo, fenômenos como desidratação e decomposição, associados à perda de massa, são observados por ambas as técnicas, ao passo que, eventos relacionados a mudanças conformacionais e transição de fase foram observados apenas através da DTA. O experimento foi realizado em atmosfera de ar natural a 298 mL/min e taxa de aquecimento de 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Foi utilizado cadinho de alumina e massa aproximada de 3,5 mg para cada composto.

4.4.3 Análise de RMN

As análises de RMN de ^1H do RhCl_3 , da pCD e dos complexos foram realizadas por colaboradores do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX400 série AVANCE a 400 MHz. As amostras foram dissolvidas em óxido de deutério (D_2O), utilizando o sinal da água como referência interna para os espectros de ^1H RMN. Para a edição dos espectros foi utilizado o software MestReC[®].

4.4.4 Fotometria de espalhamento de luz dinâmico

A caracterização nanoestrutural dos componentes da formulação por meio de medidas de tamanho (diâmetro hidrodinâmico - D_h) do complexo Rh(III)/pCD foi realizada em suspensão aquosa, por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Foi utilizado o módulo fotométrico de DLS Zetasizer Nano ZS90 Malvern a $25\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno com caminho óptico de 1 cm padrão Malvern e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm) com intensidade de luz espalhada medida em ângulo de 90° . O D_h foi determinado através da média de cinco medidas independentes, sendo cada uma delas a partir da média de cinco contagens. Foram realizadas titulações de Rh(III) 60 mM na solução de pCD 4 mM, havendo a formação do complexo Rh(III)/pCD do qual foi determinado o D_h . Foram realizadas 50 injeções manuais (10 injeções de 5 μL e 40 injeções de 10 μL) do Rh(III) em 1,5 mL da solução de pCD. O tratamento dos dados foi realizado através do software Microcal Origin 9.0.

4.4.5 Determinação do potencial zeta

A determinação do potencial zeta, foi realizada utilizando-se procedimento similar àquele realizado para os experimentos de avaliação do diâmetro hidrodinâmico citado anteriormente. As suspensões foram vertidas em uma nova cubeta de polietileno, a qual é imersa à célula de medida (Dip Cell) e analisadas no módulo Zetasizer Nano-ZS 90 por meio de micro-eletroforese laser-doppler (MELD) com o espalhamento de luz em angulação de 173° e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética calculados pelo módulo de Smoluchowski. O valor final do potencial zeta foi obtido pela média de cinco medidas independentes com cinco contagens cada e o tratamento dos dados foi executado no programa Microcal Origin 9.0.

4.4.6 Titulação calorimétrica isotérmica

A determinação da estequiometria de complexação foi realizada por meio de titulações calorimétricas isotérmicas envolvendo o ligante Rh(III) e a pCD a 25 °C . O

experimento foi realizado em duplicata com o emprego de um Microcalorímetro VP_ITC Microcal seguindo o padrão de rotação de 300 rpm, tempo de injeção de 2 segundos, tempo de equilíbrio de 5 minutos, 51 injeções automáticas de 5 μL de RhCl_3 a 60 mM em 1,5 mL de pCD a uma concentração de 2 mM de base monomérica de βCD . Os dados obtidos foram tratados com a utilização do software Microcal Origin 9.0 para ITC fornecido pela Micro Cal. Os cálculos das propriedades termodinâmicas (N , K , $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r H^\circ$ e $T\Delta_r S^\circ$) foram realizados através do mesmo software.

4.5 ENSAIOS *IN VITRO* COM CULTURAS DE CÉLULAS

4.5.1 Cultura celular

As linhagens celulares de macrófagos murinos RAW 264.7 e J774 A.1, as células de adenocarcinoma alveolar humano A549 e as células de tumor mamário da linhagem MCF-7 (2×10^{-5} células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços a 37 °C em 5% de CO_2 , em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e 5% de soro fetal bovino, o tempo de cultivo variou de acordo com o objetivo da atividade biológica avaliada, conforme protocolo previamente estabelecido descrito posteriormente.

4.5.2 Avaliação do efeito citotóxico do Rh(III), da pCD e do complexo Rh(III)/pCD em células tumorais A549 e MCF-7

O efeito citotóxico das substâncias nas células tumorais A549 e, MCF-7, foi estudado por meio do ensaio colorimétrico de MTT (corante Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide – Sigma, St, Louis, MO, USA). Para avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas na presença ou ausência do complexo Rh(III)/pCD nas concentrações de 50, 100 e 300 μM por 48 h. Como controle as células foram tratadas com Rh(III) puro e com pCD também nas concentrações de 50, 100 e 300 μM . Após 48 h de cultivo o sobrenadante foi removido cuidadosamente dos poços de cultura de forma que não ocorresse modificação no precipitado. Em seguida, foram adicionados 100 μL de RPMI e 10 μL de MTT (5 mg/mL) e as placas foram então incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 . Após transcorrido o período de 4 h, a reação foi finalizada com a retirada do meio e a adição de 100 μL de DMSO para a dissolução

dos cristais de formazan produzidos. As placas foram levemente agitadas para proporcionar total solubilização e a densidade óptica medida no comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplaca Multiskan™ FC Microplate Photometer. Os dados foram analisados no programa Prisma 6.0 e considerados significantes quando $p < 0,05$.

4.5.3 Avaliação da viabilidade celular em macrófagos tratados com Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD

A viabilidade celular das linhagens de macrófago RAW 264.7 e J774.A1 também foi determinada por meio do ensaio colorimétrico de MTT. Foram utilizadas as mesmas condições de cultivo celular e tratamento das células tumorais acima citadas.

Após a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT as linhagens RAW 264.7 e J774.A1 foram tratadas com Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD nas concentrações de 1200 μM , 600 μM , 300 μM , 100 μM e 50 μM para a determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular (CASTRO *et al.*, 2012).

4.5.4 Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e J771.A1 tratados com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD

A concentração de óxido nítrico (NO), indiretamente determinada pela dosagem de nitrito, foi medida no sobrenadante de cultura dos macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 utilizando-se o ensaio de Griess (TSIKAS, 2007). As células foram cultivadas por 48 horas na presença de Rh(III), pCD ou Rh(III)/pCD nas concentrações de 50, 100 e 300 μM estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IFN- γ (0,9 ng/mL). Como controles foram utilizadas células estimuladas sem tratamento e células não estimuladas e não tratadas. Para a realização do teste, em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de sobrenadante da cultura celular e igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidróclorida, 5% H_3PO_4 , Sigma, St, Louis, MO, USA). A quantificação da produção de nitritos se deu pela comparação à uma curva padrão com diferentes concentrações de NaNO_2 . A absorbância foi medida em comprimento de onda de 540 nm e a porcentagem de produção de NO foi

calculada levando-se em consideração o controle de produção, células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- γ (CASTRO *et al.*, 2012).

4.5.5 Avaliação da expressão de NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 tratados com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD

Para a análise da expressão de p65 (indiretamente NF- κ B) as células foram cultivadas na presença ou ausência de Rh(III), pCD ou Rh(III)/pCD nas concentrações de 50, 100 e 300 μ M. A cultura de macrófagos RAW 264.7 ou J774A.1 (1×10^6 células/mL) estimulados ou não com LPS (10 μ g/mL) e IFN- γ (9 ng/mL) foram mantidas por 3 h (PATIL *et al.*, 2015). Transcorridos os tempos de cultura as células foram removidas e a marcação de NF- κ B processada conforme o kit do fabricante (NF-KPA-B (PS529)-PE 558423,47 BD, Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), as células foram adquiridas no FACS Verse e analisadas no software FCS express.

Para garantir que possíveis reduções na expressão de NF- κ B não eram decorrentes de morte celular, a viabilidade foi também avaliada com 3 h de cultura para os macrófagos RAW 264.7 ou J774A.1 por meio do método de MTT conforme descrito previamente.

4.5.6 Avaliação da genotoxicidade do Rh(III), da pCD e de Rh(III)/pCD

A análise de biomarcadores de danos ao DNA se deu por meio do teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese, aplicado em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 seguindo o protocolo de Fenech (2007).

As células foram cultivadas em frasco de 25 cm² na densidade de 1×10^6 células/mL de meio de cultura RPMI suplementado e incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Após 24 h de incubação o meio de cultura foi trocado e foram adicionados, em todos os frascos, 200 μ L da solução de citocalasina B (300 μ g/mL) para obtenção da concentração final de 6 μ g/mL. Foram adicionados 50 μ L da solução de metil-metanosulfonato (MMS) a 7,5 mg/mL no frasco correspondente ao controle positivo, além disso, foram adicionados, nos respectivos frascos, 100 μ L das soluções de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD nas concentrações de 100, 300 e 1000 μ M. Em seguida as células foram incubadas pelo período de 48 h.

Após o tempo de incubação realizou-se a colheita de células e o preparo das lâminas. Para isso as células foram removidas do frasco com o auxílio de um *scraper*, transferidas para um tubo Falcon devidamente identificado e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado preservando-se cerca de 0,5 mL onde o *pellet* foi homogeneizado. Em seguida foram adicionados 5 mL da solução de citrato gelada na concentração de 0,01% e feita a homogeneização durante 5 minutos. Ao final foram adicionados 20 µL de formol e realizada nova centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado preservando-se cerca de 0,5 mL, o *pellet* foi homogeneizado por 20 vezes, a suspensão de células foi aspirada e mantida no interior da pipeta Pasteur para a adição de 5 mL do fixador metanol/ácido acético (3:1) seguida de imediata homogeneização. Mais uma vez os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 5 min e o sobrenadante descartado até restar aproximadamente 0,5 mL para ressuspender o *pellet*.

Para o preparo das lâminas, inicialmente elas foram lavadas com o detergente Extran® até se observar a formação de um filme de água sobre elas. Depois de lavadas, foram acondicionadas em um béquer de vidro contendo água destilada suficiente para cobri-las totalmente e mantidas refrigeradas até o momento do uso. Com a lâmina inclinada foram adicionadas duas gotas da suspensão de células em locais distintos por cima do filme d'água, elas foram deixadas em suporte para secagem em temperatura ambiente de um dia para o outro. Depois da completa secagem, as lâminas foram coradas utilizando-se a solução de laranja de acridina (40 µg/mL) – a solução foi adicionada até cobrir completamente a lâmina posicionada no suporte de coloração. Após 2 min a lâmina foi lavada em água destilada com o auxílio de uma pisseta durante 1 min.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x de acordo com os seguintes critérios:

- para o cálculo do índice de divisão nuclear foram contadas 500 células especificando-se dentre elas a quantidade de mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e polinucleadas.
- para análise dos biomarcadores de danos ao DNA foram contadas 2000 células binucleadas registrando-se o número de células com a presença de micronúcleo, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares.

Para calcular o índice de divisão nuclear foi utilizada a fórmula: $([M1^2 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]) / N$. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.6 ENSAIOS *IN VIVO*

4.6.1 Indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD

Para a realização do ensaio foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c com peso médio de 25 g, 6 a 8 semanas de idade adquiridos no Núcleo de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em grupos de 05 nas gaiolas de polipropileno medindo 30,5 cm de comprimento x 19,7 cm de largura x 20 cm de altura forradas com maravalha de pinus autoclavada e acondicionadas em estantes ventiladas com exaustão do ar. Eles receberam dieta *ad libitum* à base de água filtrada e clorada e ração industrializada da marca NUVILAB-CR1. Todo experimento foi conduzido de acordo com os princípios do Código de Ética Brasileiro para Utilizações de Animais de Laboratório. Experimentação aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – campus Mucuri (Protocolo 01/2019R).

As substâncias testadas e o comprimido de dexametasona 2 mg, foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS). O Rh(III), a pCD e o complexo foram testados na concentração de 5 mg/Kg (MORRIS, 2003).

A indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com o Rh(III), pCD e com o complexo Rh(III)/pCD foram realizadas conforme descrito a seguir.

Após a pesagem os animais foram organizados em cinco grupos (n = 5 animais/grupo), como descrito abaixo (Quadro 1), e suas patas foram medidas com paquímetro (0h). Os animais tratados com dexametasona foram utilizados como referência pela conhecida atividade anti-inflamatória dessa substância. Trinta minutos antes da indução do edema nas patas, os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com PBS (100 µL), dexametasona (0,5 mg/kg), com Rh(III) (5 mg/Kg), com pCD (5 mg/Kg) e com Rh(III)/pCD (5 mg/Kg). A carragenina foi dissolvida em PBS

(2,5 %), 20 µL foram injetados no coxim plantar da pata esquerda e 20 µL de PBS no coxim plantar da pata direita como controle de fidelidade.

As patas direita e esquerda foram medidas 1, 2 e 3 h após a injeção da carragenina, e a diferença entre elas calculada pela fórmula: [Variação do Edema de pata (mm)] = [medida da 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).

Quadro 1 - Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos tratamentos para indução do edema de pata com inoculação de carragenina.

GRUPO	INDUÇÃO	TRATAMENTO
I - PBS	Induzido com carragenina (2,5 %)	Tratado com PBS
II – Dexametasona	Induzido com carragenina (2,5 %)	Tratado com dexametasona (0,5 mg/kg)
III – Rh(III)	Induzido com carragenina (2,5 %)	Tratado com Rh (III) (5 mg/Kg)
IV - pCD	Induzido com carragenina (2,5 %)	Tratado com pCD (5 mg/Kg)
V - Rh(III)/pCD	Induzido com carragenina (2,5 %)	Tratado com Rh(III)/pCD (5 mg/Kg)

FONTE: Elaborado pela autora (2021)

4.6.2 Avaliação da hipersensibilidade tardia em camundongos através da inoculação de ovalbumina e o tratamento com Rh(III), pCD e com Rh(III)/pCD

Para a realização do ensaio foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c com peso médio de 24 g, 4 a 5 semanas de idade adquiridos no CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em grupos de 05 por gaiola em estantes ventiladas com exaustão de ar. Eles receberam dieta *ad libitum* à base de água filtrada e clorada e ração industrializada da marca NUVILAB-CR1. Todo o experimento foi conduzido de acordo com os princípios do Código de Ética Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – campus Mucuri (Protocolo nº 02-2021 R).

Para o modelo de inflamação tardia *in vivo*, inicialmente os animais foram pesados e divididos em 06 grupos (n = 5 animais/grupo) conforme descrito no Quadro

2. Os animais tratados com dexametasona foram utilizados como referência, tendo em vista a conhecida atividade anti-inflamatória desse composto. Para a indução da inflamação foram inoculados na base da cauda dos animais 200 μ L de ovalbumina (Sigma) grade V (1 mg/mL) emulsificada com adjuvante completo de Freund's - CFA (1:1). Os tratamentos foram por via intraperitoneal, o grupo dexametasona recebeu 0,5 mg/kg/dia diluída em PBS, os grupos Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD receberam 5mg/Kg/dia, os tratamentos foram realizados durante seis dias após a indução (dpi). No 7º dpi foram injetados 30 μ L de ovalbumina grade II (20 mg/mL) no coxim plantar esquerdo e igual volume de PBS no direito.

Quadro 2 - Divisão dos grupos dos camundongos BALB/c e os respectivos tratamentos para DTH.

GRUPO	INDUÇÃO	TRATAMENTO
I – Hígido	Não induzido	Não tratado
II – PBS	Ovalbumina grade V 1mg/mL emulsificada (1:1) com CFA	PBS
III – Controle positivo	Ovalbumina grade V 1mg/mL emulsificada (1:1) com CFA	Tratado com dexametasona (0,5mg/kg i.p.) diluída em PBS
IV – Rh(III)	Ovalbumina grade V 1mg/mL emulsificada (1:1) com CFA	Tratado com Rh(III) (5 mg/Kg i.p.) diluído em PBS
V - pCD	Ovalbumina grade V 1mg/mL emulsificada (1:1) com CFA	Tratado com pCD (5 mg/Kg) (5mg/kg i.p.) diluída em PBS
VI - Rh(III)/pCD	Ovalbumina grade V 1mg/mL emulsificada (1:1) com CFA	Tratado com Rh(III)/pCD) (5mg/kg i.p.) diluída em PBS

FONTE: Elaborado pela autora (2022)

As patas esquerda e direita foram medidas 48 h após a injeção de ovalbumina e a diferença calculada. Os camundongos foram eutanasiados sob anestesia (cetamina + xilazina) e foram retirados sangue, baço, linfonodos inguinais e patas. O coxim plantar, os linfonodos e o baço foram macerados, homogeneizados e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80° C. O sangue foi centrifugado e o plasma congelado a -80 °C. Os resultados apresentados são representativos da média \pm desvio padrão. A significância entre os grupos foi analisada utilizando Student's test, teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Twoway ANOVA (GraphPad Prism 5.0). As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes e serão mostrados como média \pm desvio 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 $p < 0,05$.

6 RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

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

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é amplamente utilizada para caracterização química de uma infinidade de materiais. Essa técnica é baseada nas vibrações moleculares dependentes de massas atômicas, forças de ligação e interações intra e intermoleculares para fornecer o espectro de absorção único de um dado composto que pode ser comparado aos espectros de referência disponíveis na literatura (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2010; MOHAMED *et al.*, 2017).

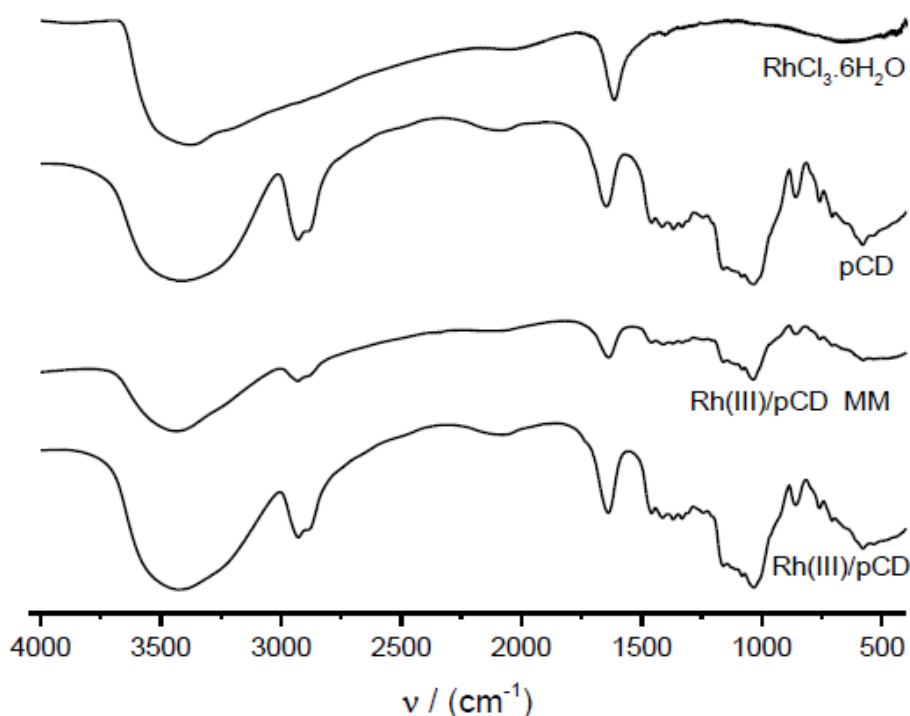
No espectro eletromagnético a região do infravermelho IV é subdividida em três regiões: infravermelho próximo (780 - 2500 nm), infravermelho médio (2500 - 50000 nm) e infravermelho distante (50000 nm - 1 mm). A grande maioria das moléculas apresenta banda de absorção na região do infravermelho médio, entre 4000 e 400 cm^{-1} . Em geral, ligações simples (O-H, C-H e N-H) são detectáveis entre 2500 e 4000 cm^{-1} , ligações duplas entre 2000 e 2500 cm^{-1} e as ligações triplas observadas entre 1500 e 2000 cm^{-1} (MOHAMED *et al.*, 2017).

Durante a formação dos complexos de coordenação ocorrem diversas ligações químicas que provocam mudanças nos átomos que compõem as moléculas envolvidas, podendo perturbar o momento de dipolo das ligações de grupos funcionais. Essa perturbação nos momentos de dipolo é evidenciada pela alteração de intensidade, ao passo que mudanças na energia dos modos vibracionais, correspondem aos deslocamentos das bandas no espectro (DENADAI *et al.*, 2006; SWARBRICK, 2007).

A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar as ligações entre Rh(III) e pCD e notificar as alterações de bandas encontradas das amostras, fazendo a comparação com a pCD pura, $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e mistura mecânica. A mistura mecânica permite demonstrar que o complexo de coordenação apresenta características físico-químicas diferentes daquelas observadas na simples mistura de compostos isolados e que é

necessário tempo de contato entre as espécies em solução, para que a interação de fato ocorra. Os espectros obtidos estão representados na figura 9.

Figura 9 - Espectros de infravermelho do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pCD, MM e Rh(III)/pCD na região de 4000 a 400 cm^{-1} em KBr



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: cloreto de ródio III hexahidratado; pCD: policiclodextrina; MM: mistura mecânica; Rh(III)/pCD: complexo de coordenação ródio(III)/policiclodextrina; KBr: brometo de potássio.

É necessário ressaltar que como a pCD é um polímero de ciclodextrinas a atribuição dos seus sinais se torna complexa. Entretanto, ao comparar os espectros obtidos, é possível observar mudanças em vários modos vibracionais da pCD sugerindo restrições de grupos funcionais de pCD após a formação dos complexos. Na tabela 1 estão descritas as principais bandas observadas nos espectros de pCD e Rh(III)/pCD.

Tabela 1 - Principais bandas de FTIR da pCD e Rh(III)/pCD

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C-H})$, CH_2 e $\text{CH}_3/\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{O-H}$, água de hidratação/ cm^{-1}	Vibração do anel piranose / cm^{-1}
pCD	3490 cm^{-1}	2932 cm^{-1}	1637 cm^{-1}	$1158; 1028 \text{ cm}^{-1}$
Rh(III)/pCD	3450 cm^{-1}	2981 cm^{-1}	1645 cm^{-1}	1162 cm^{-1}

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

A interação do Rh(III) com a pCD estabelece um novo padrão de interações, o que altera o número de ondas de determinados grupos funcionais, e é isso evidenciado pelos resultados aqui apresentados. As modificações nas bandas mostram, através da redução da absorção em 3490 cm^{-1} e do aumento das bandas em 1637 cm^{-1} e 2932 cm^{-1} que o Rh(III) está sendo ligado, respectivamente, aos grupos O-H e C-H durante a formação do complexo.

Os espectros aqui apresentados corroboram com outros trabalhos presentes na literatura como o de Zhong e colaboradores, que apresentaram o espectro da pCD com picos em 3380 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} , correspondendo, respectivamente ao estiramento de O-H, estiramento de C-H, estiramento e deformação de O-H e deformação de C-H (ZHONG *et al.*, 2020).

Pratt e colaboradores (2010) encontraram dados similares em seus estudos nos quais sintetizaram polímeros de β CD com epícloridrina em diferentes proporções molares (1:15, 1:25 e 1:35). Seus resultados mostram que nas três diferentes proporções o polímero se comportou de maneira semelhante, com picos de 3400 cm^{-1} (estiramento de O-H), 3000 cm^{-1} (estiramento de C-H) e 1040 cm^{-1} (estiramento de C-O-C). Resultados semelhantes também são apresentados por Binello e colaboradores (2008) em estudo no qual obtiveram picos de 3400 , 3000 , 1452 , 1253 , 1040 cm^{-1} .

Com o objetivo de remover íons de metais pesados de águas de esgoto, Shahabi Nejad e colaboradores (2020) desenvolveram um complexo de tioureia e policiclodextrinas e, ao caracterizar sua molécula de pCD apresentaram, no espectro de FTIR, ligações de vibração de C-C, C-O e C-O-C em 1032 , 1081 , 1158 cm^{-1} , respectivamente. Nos espectros do complexo, as bandas em 2271 e $1554\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas à vibração de estiramento S-H e C-N, respectivamente, e ainda de acordo com os autores, as intensidades de pico dos grupos epóxido foram reduzidas em grande medida, indicando que grandes proporções desse grupo desapareceram devido à reação com a tioureia.

Estes e outros resultados presentes na literatura (ORPRECIO; EVANS, 2003) servem como base para legitimar a formação do complexo Rh(III)/pCD e sua caracterização em estado sólido aqui apresentada.

6.1.2 Análise termogravimétrica, termogravimetria derivada (TGA/DTG) e análise térmica diferencial (DTA)

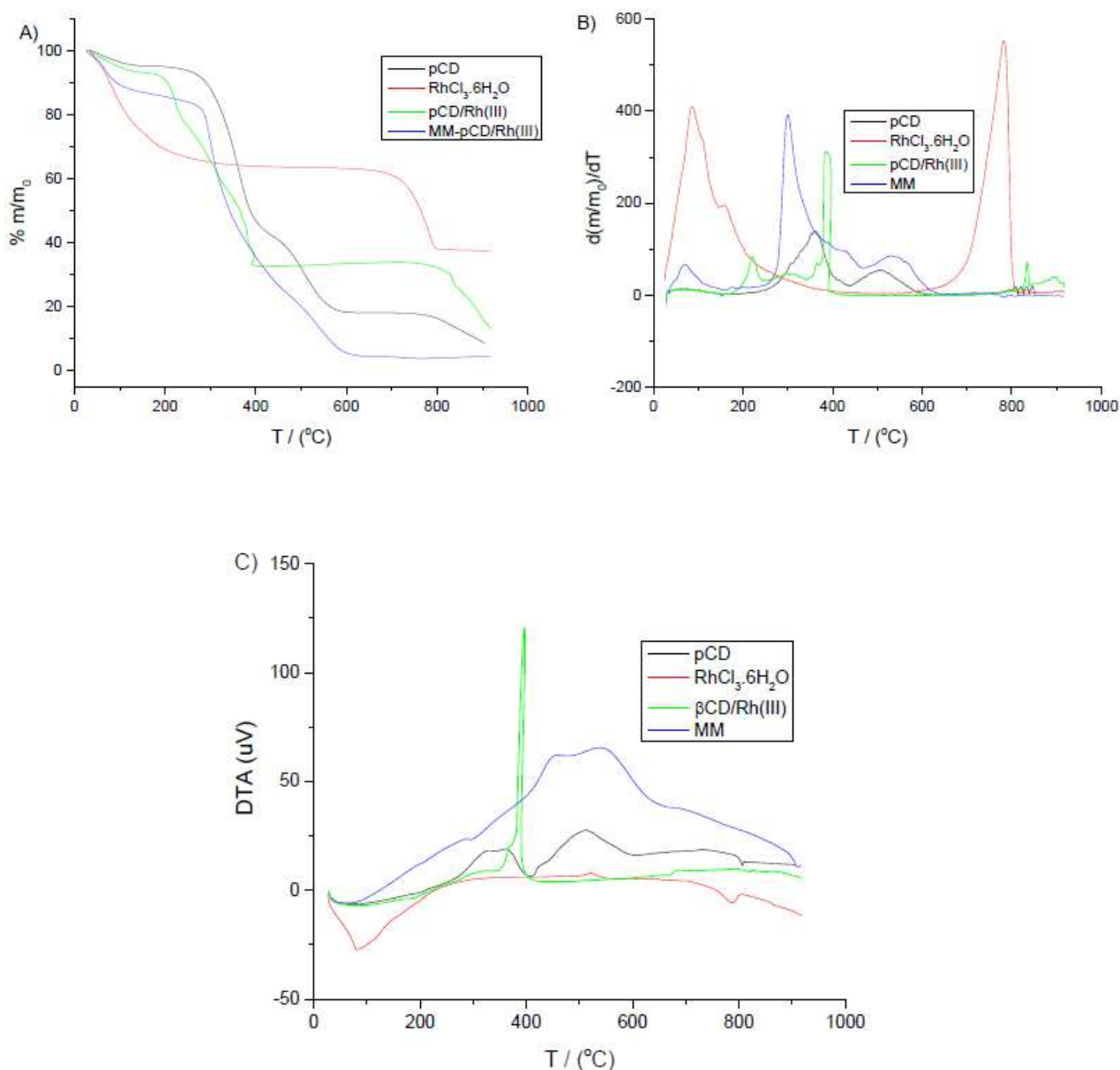
As técnicas de análises térmicas são importantes ferramentas para o estudo de diversos materiais, elas compreendem métodos como termogravimetria (ou análise termogravimétrica), análise térmica diferencial, calorimetria de varredura diferencial, análise termomecânica, entre outros, que proporcionam o conhecimento de diferentes propriedades do material em questão (HĂDĂRUGĂ; BANDUR; HĂDĂRUGĂ, 2018).

Independentemente da técnica aplicada, a temperatura da amostra é alterada em uma faixa predeterminada e as propriedades físicas são contínua e automaticamente registradas, podendo haver reações de natureza endotérmica ou exotérmica. Por meio da análise termogravimétrica é possível obter informações acerca das transições de fase como a vaporização, sublimação, absorção e dessorção, além de dados sobre eventos de natureza química como desidratação e decomposição. A análise termogravimétrica é realizada em uma termobalança que registra a perda ou ganho de massa da amostra em função da temperatura e do tempo dando origem a curva da TGA.

A análise térmica diferencial, inventada em 1899, é uma técnica que afere a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência termicamente inerte enquanto são aquecidos ou resfriados em um forno. A aplicação dessa técnica permite determinar a natureza dos eventos – endotérmicos e exotérmicos – através do fluxo de calor que resulta da diferença entre a temperatura do material de referência e da amostra em função da temperatura ou do tempo. Os resultados obtidos nesse tipo de análise retratam a estabilidade térmica dos complexos, sendo, portanto, de grande importância, uma vez que a complexação pode alterar as propriedades térmicas dos precursores (OZAWA, 2000).

As curvas de TGA, DTG e DTA da pCD, $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Rh(III)/pCD e MM estão representadas na Figura 10.

Figura 10 - Curvas de TGA (A); DTG (B) e DTA (C) da pCD, $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Rh(III)/pCD e MM



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: (%m/m₀): massa normalizada para 100%; d(m/m₀)/dT: derivada da perda de massa com a temperatura; TGA: análise termogravimétrica; DTA: análise térmica diferencial; DTG: derivada da análise termogravimétrica; pCD: policiclodextrina; $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: cloreto de ródio (III) hexahidratado; Rh(III)/pCD : complexo de coordenação do Rh(III) com pCD; MM: mistura mecânica; °C: grau Celsius.

Na curva TGA/DTG da pCD é possível observar a desidratação da molécula que ocorreu entre 30 e 133 °C aproximadamente com conseqüente redução de 4,3% da massa. Em seguida estão representados três eventos de decomposição com perda de 58,0% da massa entre 231 e 438 °C no primeiro, redução de 81,6% até a temperatura de 596 °C no segundo e, no terceiro evento de decomposição, observa-

se o resíduo correspondente a 8,6% da massa após atingida a temperatura de 904 °C.

Quanto ao $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, os resultados de TGA/DTG mostraram a ocorrência de um evento de perda de 36% da sua massa no intervalo de 32 °C a 317 °C referente à desidratação, que precedeu uma estabilidade térmica até aproximadamente 650 °C, quando ocorre um segundo evento de perda equivalente a 30% de massa. Em seguida é possível observar um período de estabilização com a formação de um resíduo de 38% de massa, atribuído à decomposição do RhCl_3 em Rh(III) metálico não volátil. A curva de DTA do $\text{RhCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi apresentada o primeiro evento endotérmico entre 30 °C a 217 °C referente à desidratação do composto e entre 700 °C e 810 °C, outro evento endotérmico foi observado, dessa vez atribuído ao início da decomposição das moléculas de cloro, formando o Rh(III) metálico.

Ao analisar o comportamento térmico da MM nota-se uma semelhança com o perfil do complexo Rh(III)/pCD quanto aos eventos iniciais de perda de moléculas de água e decomposição até a temperatura aproximada de 250 °C, ao passo que, ao atingir a temperatura aproximada de 602 °C a MM, que sofreu dois eventos de decomposição, se apresentou com massa equivalente 5,42%. Quanto ao complexo, na curva estão evidenciados três eventos de decomposição nas temperaturas aproximadas de 93 a 230 °C, 390 °C e 391 a 827 °C com perda final de 69,7% da sua massa.

É importante ressaltar que não houve sobreposição das curvas de TGA/DTG e DTA da MM e do complexo, o que permite dizer que existem diferenças significativas em relação às ligações estabelecidas, confirmando a formação do complexo em estado sólido, bem como a importância do contato entre as espécies na fase líquida para que as interações sejam estabelecidas.

Nas análises térmicas do complexo formado por policiclodextrinas e tiouréia, os pesquisadores observaram, por meio da TGA, o início da degradação da pCD à temperatura de 290 °C e sua pirólise na faixa de 290 a 420 °C onde o polímero perdeu 81% da sua massa, enquanto o complexo pCD/ECH-TU apresentou início da degradação em 260 °C com pirólise entre 260 e 440 °C. A curva de DTG da molécula de pCD evidenciou dois picos: 271 e 342 °C, que corresponderam às perdas de peso da decomposição do polímero (SHAHABI NEJAD *et al.*, 2020).

Gidwani, Vyas e Kaur (2018) estudaram a inclusão do fármaco antitumoral Gefitinib em policiclodextrinas e, para avaliar as alterações físico-químicas que

refletem a estabilidade térmica do complexo durante aquecimento, aplicaram a técnica de DTA. Em seus resultados apresentaram os seguintes dados: amplo pico endotérmico na curva da pCD entre 100 e 250 °C refletindo o processo de desidratação e um pico endotérmico na curva do fármaco na forma livre à temperatura de 184,7 °C, que corresponde ao seu ponto de fusão. Em relação ao complexo foi observado um pequeno pico endotérmico próximo a 130 °C que, de acordo com os autores, pode estar associado à desidratação da molécula de pCD. Ainda de acordo com eles, esse pico é menor devido à troca do fármaco pelas moléculas de água localizadas na cavidade da pCD. Observaram ainda o desaparecimento do pico correspondente ao ponto de fusão do fármaco livre, corroborando com a sua inclusão na cavidade da pCD. Os autores afirmam que o complexo é ligeiramente menos estável em altas temperaturas, uma vez que sua decomposição ocorre a uma temperatura (192,8 °C) comparativamente mais baixa do que dos seus precursores.

García-Zubiri, González-Gaitano e Isasi (2006), por meio de TGA/DTG e DTA, avaliaram a estabilidade térmica de dois derivados de naftaleno, aqui referidos como “derivado 1” e “derivado 2”, em complexos de inclusão com moléculas de β CD e pCD. Para análise dos resultados os autores consideraram o padrão térmico em três etapas, a saber: (I) abaixo de 150 °C – perda do solvente (água e/ou propanol) e fusão do derivado de naftaleno; (II) 150 a 285 °C – perda do derivado de naftaleno por volatilização e (III) acima de 285 °C – degradação da β CD ou pCD.

Os autores observaram que nos sistemas com β CD a estabilidade do complexo com o derivado 1 é menor que a do complexo com o derivado 2, sendo ambos mais estáveis que a mistura mecânica correspondente, e quando compararam com os sistemas com a pCD, concluíram que estes são mais estáveis do que os sistemas com a β CD em temperatura ambiente ou não (GARCÍA-ZUBIRI; GONZÁLEZ-GAITANO; ISASI, 2006).

Como pode ser observado, os estudos acima apontaram resultados semelhantes aos dados aqui apresentados em relação aos eventos de desidratação policiclodextrina. Outro ponto de concordância entre os resultados aqui apresentados e os dados disponíveis na literatura é o fato de os complexos estudados apresentarem maior estabilidade em relação às suas misturas mecânicas. Quanto ao início da decomposição da pCD, no presente estudo foi observada uma temperatura menor quando comparada aos demais, diferença que pode estar relacionada ao processo de síntese da molécula.

6.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H

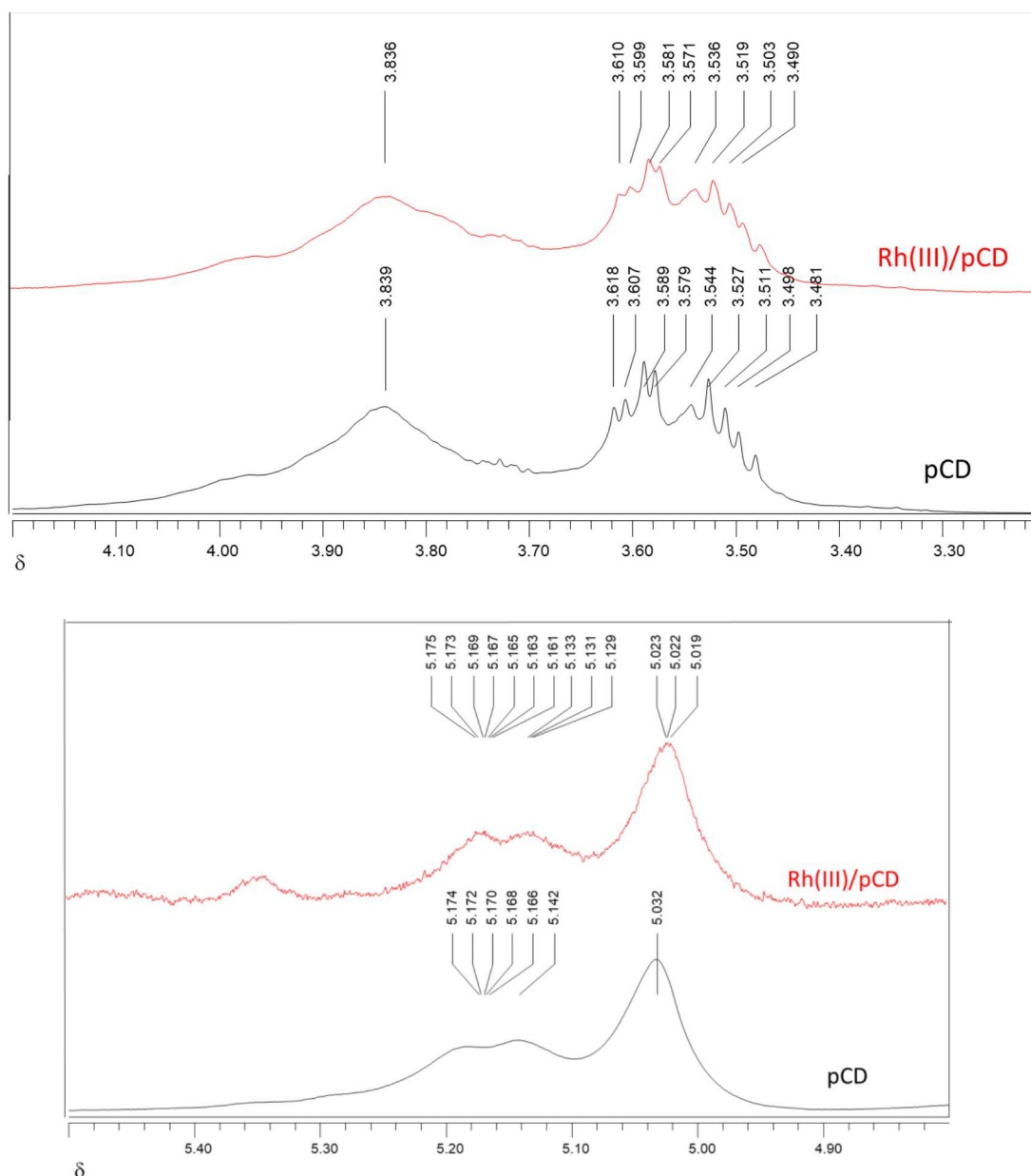
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica que fornece informações estruturais e dinâmicas de moléculas, seja em solução ou no estado sólido. O princípio da técnica é a absorção da radiação eletromagnética na região das radiofrequências, sendo o fenômeno observado em núcleos que possuem um momento magnético. Quando colocados em um campo magnético, os momentos nucleares se alinham em uma orientação determinada pelo spin nuclear, que é uma propriedade fundamental de certos núcleos. Os sinais de RMN refletem as mudanças detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados retornam ao seu estado fundamental. Os núcleos mais frequentemente estudados em RMN são ^{13}C e ^1H , cujo spin é igual a $\frac{1}{2}$, possuindo assim, duas orientações: alinhado com o campo magnético ou contra ele (SWARBRICK, 2007).

Com elevada sensibilidade e fácil interpretação dos dados, as análises por RMN são amplamente utilizadas para avaliar a formação de complexos entre ciclodextrinas e diferentes moléculas de interesse (BINELLO *et al.*, 2008; CRINI, 2020; LIU *et al.*, 2020), ela permite caracterizar o complexo a partir das modificações dos sinais da matriz, que resultam de alterações provocadas pela coordenação com o ligante, tendo em vista que as interações entre as moléculas provoca mudanças na distribuição eletrônica dos átomos envolvidos e altera o momento magnético nuclear resultante.

O espectro obtido na RMN permite confirmar as interações intermoleculares e/ou formação de novas ligações evidenciando as variações no deslocamento químico, alterações no perfil do sinal ou nas suas intensidades (SWARBRICK, 2007; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

A figura 11 apresenta a sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da policiclodextrina e do seu complexo de coordenação com o Rh(III). É importante ressaltar que, uma vez que o Rh(III) não apresenta nenhum átomo de hidrogênio diretamente ligado, não é possível obter o espectro de RMN deste composto. Dessa forma, as interações foram averiguadas a partir dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio da policiclodextrina.

Figura 11 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da pCD e Rh(III)/pCD em D_2O , 400 MHz.



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio; pCD: policiclodextrina (preto); Rh(III)/pCD: complexo de coordenação ródio(III)/policiclodextrina (vermelho); D_2O : Óxido de deutério; MHz: mega-hertz; ppm: partes por milhão.

As atribuições e os valores dos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios, referentes aos espectros da figura 11, se encontram detalhados na tabela 2. Os Hidrogênios H1' e H1'' são isômeros espaciais do hidrogênio H1, conforme descrito na literatura (LI *et al.*, 2004).

Tabela 2 - Atribuições e os valores dos deslocamentos químicos dos sinais de pCD e Rh(III)/pCD referentes aos espectros de RMN de ^1H

Atribuições		pCD (ppm)	Complexo	
			Rh(III)/pCD (ppm)	$\Delta\delta$
H2	CH	3,590	3,598	0,008
H4	CH	3,511	3,503	0,008
H3 – H5	CH ¹	3,839	3,836	0,003
H1	-CH	5,033	5,022	0,011
H1'	-CH	5,183	5,173	0,010
H1''	-CH	5,145	5,133	0,012

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: pCD: policiclodextrina; Rh(III)/pCD: complexo de coordenação ródio(III)/policiclodextrina; $\Delta\delta$: variação do deslocamento dos sinais de ^1H da pCD no respectivo complexo; ppm: partes por milhão. ^1H Hidrogênios 3 e 5 da pCD são descritos na literatura como uma banda larga entre 4,7 e 5,4. Aqui, apresentaram máximo em $\approx 3,83$.

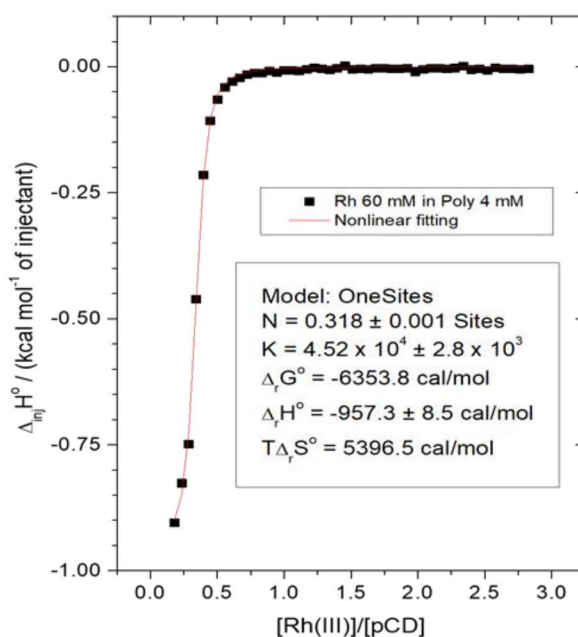
6.1.4 Titulações calorimétrica isotérmicas

A titulação calorimétrica isotérmica (ITC) é uma importante ferramenta para a caracterização de complexos, sendo um dos métodos mais sensíveis para a determinação da estequiometria da interação, da constante de afinidade (também chamada de estabilidade ou constante de associação) e da mudança de entalpia, que reflete o calor liberado ou absorvido durante a interação. Além disso, a entropia e a energia livre de Gibbs do processo podem ser calculadas a partir dos dados de ITC, ou seja, permite a obtenção de um perfil termodinâmico completo (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012).

A técnica se baseia em mensurar o calor liberado ou absorvido durante a formação das interações moleculares – o instrumento possui duas células, uma para a mostra e uma de referência – e monitora constantemente a temperatura dessas células para manter o equilíbrio térmico. Quando a solução de Rh(III) (na forma de RhCl_3) é adicionada à solução de pCD, o calor gerado em função da interação entre as moléculas é proporcional à quantidade de pCD adicionada. A liberação de calor tende a diminuir progressivamente até a saturação das interações entre titulante e titulado. Em seguida a área de cada pico é integrada em função da razão molar dos dois reagentes e a curva de titulação pode então ser ajustada a vários modelos tornando possível determinar as constantes de associação, a estequiometria e os perfis termodinâmicos da interação (KABIRI; UNSWORTH, 2014).

A curva de titulação do cloreto de Rh(III) em pCD está representada na Figura 12.

Figura 12 - Titulação calorimétrica isotérmica de RhCl_3 (60 mM) em pCD (4mM) a 25 °C.



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: ITC: titulação calorimétrica isotérmica; pCD: policiclodextrina; 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.

Inicialmente foram realizadas as titulações do composto em água (diluição) e então na policiclodextrina. Após a subtração dessa curva de diluição (branco), obteve-se a curva final de titulação. Esse procedimento é necessário para evitar os possíveis efeitos de interação soluto-soluto, soluto-solvente e solvente-solvente, e avaliar apenas as interações soluto-policiclodextrina (PASSOS *et al.*, 2013). Os dados termodinâmicos da interação de RhCl_3 e pCD obtidos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos de interação entre o RhCl_3 e pCD a 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)/pCD	$0,318 \pm 0,001$	$4,5 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	- 6353,8	$-957,3 \pm 8,5$	5396,5

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: Rh(III)/pCD: complexo de coordenação ródio(III)/policiclodextrina; 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.

Como pode ser observado, há uma inflexão na curva em $N = 0,3$, o que sugere a estequiometria do complexo de 1:3, ou seja, 1 átomo de Rh(III) para cada 3

monômeros de pCD. O $\Delta_r H^\circ$ na análise do ITC representa o calor global resultante da interação do cátion Rh(III) com a pCD, dessa forma, o valor aqui obtido ($-957,3 \pm 8,5$) indica que a reação de complexação é de natureza exotérmica. Os principais determinantes envolvidos são as ligações covalentes Rh(III)-pCD. Os dados de $\Delta_r H^\circ$ e $T\Delta_r S^\circ$ permitem inferir sobre os diferentes tipos de forças envolvidas nas interações Rh(III)/pCD – ligações covalentes e interações íon-dipolo são dirigidas por entalpia e as hidrofóbicas (dessolvatação) por entropia (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012), portanto, ao analisar a titulação do Rh(III) em pCD é possível inferir que as interações foram direcionadas tanto por entalpia ($\Delta_r H^\circ = -957.3$ cal/mol) quanto por entropia ($T\Delta_r S^\circ = 5396,5$ cal/mol), com elevada constante de ligação $K = 4,52 \times 10^4$. A grande afinidade do Rh(III) em relação à pCD se justifica pelo fato de que esta ciclodextrina tem suas hidroxilas parcialmente ionizadas, em função da sua síntese em meio básico, o que favorece uma atração eletrostática.

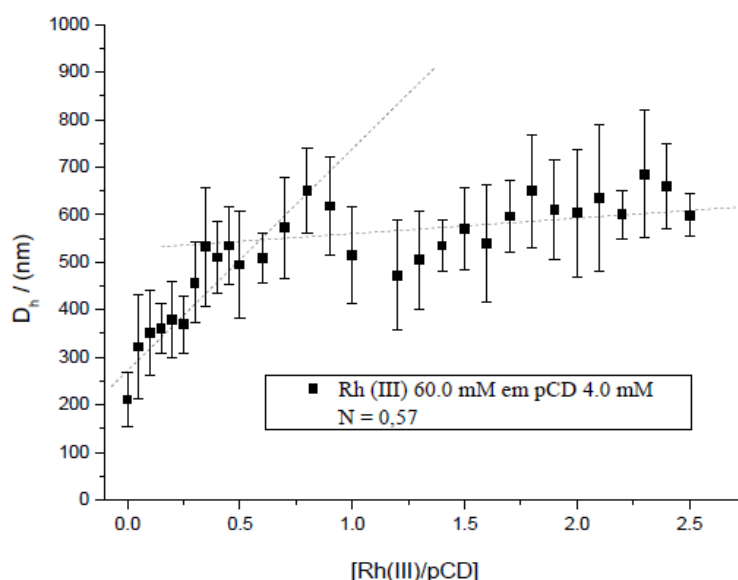
6.1.5 Fotometria de espalhamento de luz dinâmico e Potencial zeta

Quando em um meio líquido, as partículas se movem de forma aleatória (movimento Browniano) em função de colisões com as moléculas do meio de dispersão – partículas de menor tamanho se movimentam mais rapidamente que partículas grandes. O espalhamento de luz dinâmico é uma importante ferramenta para determinar o tamanho médio de nanoestruturas em solução baseada na detecção das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas. A técnica consiste na aplicação de um feixe de laser monocromático que vai gerar o espalhamento de luz pelas partículas presentes na amostra. A medida da intensidade de luz espalhada permite detectar e analisar o movimento browniano das partículas para obter seu diâmetro hidrodinâmico, um dos principais parâmetros físico-químicos para a caracterização de espécies nanométricas em suspensão (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

A variação da intensidade de luz espalhada está relacionada com o tamanho das partículas, dessa forma, um sistema composto apenas por partículas pequenas apresentará uma variação elevada da intensidade de espalhamento de luz, uma vez que pelo seu movimento rápido, elas passam pela janela do detector várias vezes em um intervalo de tempo determinado (XU, 2015).

Sabendo que soluções de ciclodextrinas são passíveis de sofrer agregação formando nanoestruturas com tamanho em torno de 200 nm (ZHONG *et al.*, 2020), além do fato da utilização de ciclodextrinas macromoleculares poderia gerar novas possibilidades de agregados, no presente estudo foram realizadas medidas de tamanho de partículas, tendo em vista que eles podem agir como moduladores da liberação do princípio ativo no sistema. A figura 13 mostra o gráfico de D_h dos agregados formados em solução aquosa em função da razão molar $[Rh(III)]/[pCD]$.

Figura 13 - Distribuição do tamanho dos agregados de partículas formados em solução aquosa em função da proporção da $[Rh(III)]/[pCD]$.



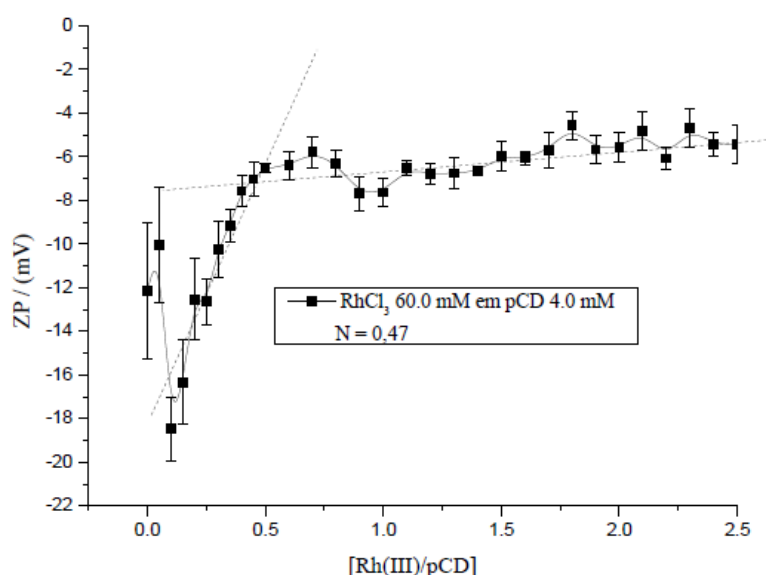
FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: D_h : diâmetro hidrodinâmico; Rh(III): ródio (III); pCD: policiclodextrina; N: estequiometria de associação; $[Rh(III)]/[pCD]$: concentração do ródio (III) dividido pela concentração da policiclodextrina.

O ponto de interseção obtido no sistema $[Rh(III)]/[pCD]$ foi na razão molar de 0,57 mM. Ao analisar o gráfico é possível observar na primeira região, até aproximadamente $N \approx 0,5$, que o aumento da concentração de Rh(III) promove um aumento dos valores de D_h para a pCD em decorrência da formação de complexos de coordenação, que se ligam uns aos outros formando estrutura supramoleculares terciárias (agregados de complexos de coordenação). Além da região de $N \approx 0,5$ nota-se que não ocorrem grandes alterações no D_h das partículas e o que justifica esse fenômeno é que após essa faixa o Rh(III) não se liga aos agregados de pCD, ou seja, o excesso de ródio não causa alteração expressiva no tamanho dos agregados.

Sistemas dispersos representam uma classe importante de formas de dosagens farmacêuticas como emulsões, suspensões, lipossomas e nanopartículas. Cargas elétricas são desenvolvidas por vários mecanismos na interface entre a fase dispersa e o meio aquoso. Além do tamanho das partículas, o potencial zeta exerce um efeito importante nas várias propriedades dos sistemas coloidais e sistemas de liberação de fármacos e a superfície das nanopartículas pode influenciar o direcionamento e distribuição de drogas – nanopartículas convencionais (sem modificação de superfície) e partículas negativamente carregadas podem, por exemplo, ser rapidamente eliminadas dos sistemas biológicos (SWARBRICK, 2007; HONARY; ZAHIR, 2013). O PZ de nanoestruturas em solução/suspensão está relacionado com sua estabilidade coloidal. Valores extremamente positivos ou negativos causam forças repulsivas, evitando agregação das partículas, o que garante maior facilidade de dispersão. Dessa forma, quando se trata de estabilização eletrostática e estérica combinada, um potencial zeta mínimo de ± 20 mV é desejável (HONARY; ZAHIR, 2013b). O gráfico de PZ em função da concentração crescente de Rh(III) em pCD está representado na figura 14.

Figura 14 - Distribuição dos valores de PZ dos agregados de complexos de coordenação em função da proporção de [Rh(III)]/[pCD].



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: PZ: Potencial Zeta; Rh (III): ródio (III); pCD: policiclodextrina; N: estequiometria de associação; [Rh(III)]/[pCD]: concentração de ródio (III) dividido pela concentração de policiclodextrina.

Os dados obtidos mostram que os agregados de pCD formados em solução aquosa apresentam valores de PZ em torno de -18 mV em função da ionização parcial das hidroxilas. Conforme mencionado anteriormente, o aumento da concentração de Rh(III) induz a formação de agregados de complexos de coordenação com ciclodextrinas até o ponto de interseção da curva de regressão linear, entretanto, essa indução é acompanhada de alterações de carga na superfície dos agregados.

Sabendo que o ródio se apresenta em solução na forma de Rh(III), é esperado que haja uma neutralização, ao menos parcial da pCD. Essa ligação justifica o aumento observado dos valores do PZ de -18 mV a -7 mV.

O ponto de interseção da curva de regressão linear no momento da saturação dos agregados de pCD pelo Rh(III) mostrou valor de 0,47. O valor de N está na mesma ordem de magnitude dos valores encontrados tanto no experimento de ITC, quanto de D_h , o que confirma a estequiometria de formação do complexo de coordenação.

6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.2.1 Avaliação do efeito citotóxico do complexo Rh(III)/pCD nas células tumorais A549 e MCF-7

A verificação da viabilidade celular é fundamental para grande parte dos ensaios *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade é rotineiramente realizada por meio do ensaio de MTT, um método colorimétrico baseado na avaliação da atividade metabólica celular. O mecanismo bioquímico do teste envolve enzimas oxidoredutases celulares que convertem o corante de MTT insolúvel em cristais solúveis de formazan (BAHUGUNA *et al.*, 2017). O presente estudo avaliou o possível efeito citotóxico do complexo Rh(III)/pCD duas diferentes linhagens de células tumorais: células de adenocarcinoma alveolar humano A549 e células de tumor mamário da linhagem MCF-7. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

Conforme observado, nenhuma substância promoveu a redução da viabilidade a valores menores que 70% após 48 h de cultivo. A maior inibição foi observada na concentração de 300 μ M, o complexo Rh(III)/pCD reduziu para $83,5 \pm 3,7$ (%) ou seja, uma redução de 16,6% na viabilidade de A549, sendo estatisticamente diferente do controle não tratado.

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 (EN ISO, 2009).

Tabela 4 - Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células de adenocarcinoma de pulmão A549 após 48 h de cultivo.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	87,8 \pm 4,7	95,2 \pm 4,0	87,9 \pm 4,2
pCD	92,5 \pm 3,0	93,7 \pm 1,6	89,3 \pm 4,6
Rh(III)/pCD	91,9 \pm 3,0	93,6 \pm 0,7	83,5 \pm 3,7*

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas *versus* células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina Rh(III)/pCD. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Tabela 5 - Avaliação da citotoxicidade do Rh (III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em células de tumor mamário MCF-7 após 48 h de cultivo.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	96,8 \pm 6,6	99,3 \pm 1,1	95,7 \pm 0,5
pCD	102,5 \pm 1,0	99,0 \pm 1,2	94,8 \pm 6,2
Rh(III)/pCD	105,6 \pm 2,5	98,5 \pm 1,9	93,2 \pm 1,6

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas *versus* células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina Rh(III)/pCD. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Jeremić e colaboradores (2017) estudaram o efeito citotóxico de complexos de Rh(III) com um amino policarboxilato do tipo EDTA também em células de adenocarcinoma de pâncreas e de tumor mamário. Em seus resultados as células A549 se mostraram sensíveis ao tratamento, enquanto não foi observado efeito citotóxico nas células MCF-7.

Ao contrário dos resultados acima, existem trabalhos que mostram efeito citotóxico positivo em células MCF-7, como o de Ruiz e colaboradores (2012), que

sintetizaram um complexo de Rh(III) ligado ao levonorgestrel para explorar sua atividade citotóxica.

Os dados presentes na literatura mostram que o ródio possui diferentes propriedades a serem exploradas para o tornarem potenciais drogas antitumorais, entretanto, sua reatividade, interação e absorção celular dependem fortemente dos ligantes que fazem parte do complexo, o que explica, por exemplo, a diferença de resultados disponíveis com linhagens de células semelhantes (GELDMACHER; OLESZAK; SHELDRIK, 2012).

6.2.2 Avaliação da viabilidade em macrófagos tratados com Rh(III), pCD e Rh(III)pCD

A viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 foi verificada após 3 e 48 h de tratamento com as substâncias e os resultados estão expressos nas tabelas 6 e 7. Em todas as concentrações testadas de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD observou-se mais de 70% de células viáveis após 3 h de cultivo (Tabela 7). 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 6 - Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em macrófagos murinos RAW 264.7 após 3 h de cultivo.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	82,0 \pm 1,3*	94,5 \pm 4,1	95,2 \pm 1,4
pCD	78,7 \pm 1,7*	86,4 \pm 1,7*	82,6 \pm 1,6*
Rh(III)/pCD	98,7 \pm 1,1	95,7 \pm 2,3	83,8 \pm 3,0*

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas versus células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina (Rh(III)/pCD). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Após 48 h de cultivo e exposição aos tratamentos com as substâncias testadas, os macrófagos RAW 264.7 continuaram a apresentar viabilidade celular acima de 70%.

Tabela 7 - Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em macrófagos murinos RAW 264.7 após 48 h de cultivo.

Viabilidade celular (%)			
Substância ^a	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	94,30 \pm 2,2	93,4 \pm 3,2	88,8 \pm 2,8*
pCD	92,2 \pm 2,7	96,5 \pm 4,6	101,1 \pm 1,9
Rh(III)/pCD	97,5 \pm 3,6	84,5 \pm 2,2*	77,1 \pm 3,2*

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas versus células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina (Rh(III)/pCD). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Os resultados mostram que nenhum dos compostos foi capaz de reduzir mais de 70% da viabilidade celular de RAW 264.7 dentro das concentrações testadas.

A viabilidade dos macrófagos J774A.1 testada após 3 e 48 h de tratamento está apresentada nas tabelas 8 e 9. Em todas as concentrações testadas de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD observou-se mais de 70% de células viáveis após 3 h de cultivo (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em macrófagos murinos J774A.1 após 3 h de cultivo.

Viabilidade celular (%)			
Substância ^a	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	92,0 \pm 3,5	86,2 \pm 1,0*	92,5 \pm 7,9
pCD	86,7 \pm 1,0*	83,2 \pm 2,0*	78,7 \pm 6,3*
Rh(III)/pCD	95,8 \pm 2,5	92,2 \pm 2,3	80,9 \pm 3,2*

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas versus células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina (Rh(III)/pCD). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Após 48 h de cultivo e exposição aos tratamentos com as substâncias testadas, os macrófagos J774A.1 continuaram a apresentar viabilidade celular acima de 70% exceto no tratamento com Rh(III)/pCD na concentração de 300 μ M (67,1 \pm 8,5) (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação da citotoxicidade do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD a 50 μ M, 100 μ M e 300 μ M em macrófagos murinos J774A.1 após 48 h de cultivo.

Substância ^a	Viabilidade celular (%)		
	50 μ M	100 μ M	300 μ M
Rh(III)	105,7 \pm 4,7	104,8 \pm 6,1	89,1 \pm 2,8
pCD	97,4 \pm 1,4	95,8 \pm 1,3	88,4 \pm 2,3*
Rh(III)/pCD	103,7 \pm 3,5	86,8 \pm 4,7	67,1 \pm 8,5*

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas versus células não tratadas (100% de viabilidade); a) Rh(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina (Rh(III)/pCD). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Após a avaliação da viabilidade celular dos macrófagos foi realizada a determinação do IC₅₀, valor da concentração que inibe o crescimento celular em 50% comparado ao grupo não tratado. Foram testadas as concentrações de 1200 μ M, 600 μ M, 300 μ M, 100 μ M e 50 μ M dos compostos, conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10 - Valores de IC₅₀ do Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em células J774A.1 e RAW 264.7.

Compostos ^a	IC ₅₀ (μ M)	
	J774A.1	RAW 264.7
pCD	>1200	>1200
Rh(III)	566	1090
Rh(III)/pCD	551	1165

FONTE: Elaborada pela autora (2021)

*p < 0,05 células tratadas versus células não tratadas (100% de viabilidade); a) cloreto de ródio(III), policiclodextrina (pCD), complexo de ródio (III) com policiclodextrina (Rh(III)/pCD). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A comparação entre os valores obtidos evidenciou que o Rh(III) puro é mais citotóxico para macrófagos J774.A1 do que para RAW 264.7, uma vez seu IC₅₀ é menor. É importante ressaltar que, muito embora ambos sejam macrófagos, é comum haver variabilidade nas respostas quando estimulados pelos mesmos agentes, uma vez que diferentes linhagens celulares apresentam padrões distintos de reações intracelulares (KAWAI, 2000; COMALADA *et al.*, 2006; JUNIOR *et al.*, 2014; CABRAL *et al.*, 2018).

Na literatura os dados a respeito do potencial imunomodulador do Rh(III) são escassos (MORAGUES *et al.*, 2013; ZHONG *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2018), o que

nos leva a comparar os resultados do presente estudo com trabalhos que utilizaram diferentes complexos à base de ródio com diferentes objetivos, como por exemplo, aqueles que avaliaram seu potencial antitumoral, que são mais frequentes.

De acordo com Leung e colaboradores (2013), a atividade citotóxica dos complexos metálicos é altamente dependente de sua eficiência de captação celular, que por sua vez pode ser regulada ajustando-se à hidrofobicidade dos ligantes conjugados.

Man e colaboradores (2011) apresentaram complexos à base de irídio (III) e ródio (III) como agentes terapêuticos para o tratamento de Alzheimer. Seus resultados mostraram que o complexo à base de Rh(III) apresentou inibição quase completa da agregação do peptídeo β -amiloide. Ao avaliar a citotoxicidade do complexo demonstraram que os efeitos antiproliferativos foram observados apenas em concentrações superiores às necessárias para a inibição completa da agregação da proteína.

O comportamento citotóxico de dois diferentes complexos à base de Rh(III) foi investigado por Jeremić e colaboradores (2017), onde observaram que, quando comparados à doxorrubicina e a cisplatina, ambos se mostraram citotóxicos para as células A549, HT-29 e HeLa. Entretanto, os mesmos complexos não foram capazes de reduzir a viabilidade de células de carcinoma mamário da linhagem MCF-7.

Kang e colaboradores (2018) desenvolveram oito complexos metálicos (identificados pelos números 1 a 8) à base de Rh(III) e Ir(III) em um estudo que identificou o complexo 1 à base de Rh(III) como inibidor da atividade de JMJD3, uma histona demetilase envolvida em processos da resposta imunológica. Por meio do ensaio MTT em macrófagos RAW 264.7 os autores apresentaram os seguintes valores de IC_{50} : $15,02 \pm 1,42 \mu\text{M}$ para o complexo 1,0 e $4,5 \pm 1,17 \mu\text{M}$ para o controle positivo.

Geldmacher, Oleszak e Sheldrick (2012) publicaram uma revisão sobre as propriedades biológicas dos compostos Rh(III) e Ir(III) na qual relatam que durante muito tempo no campo da pesquisa de novos medicamentos antitumorais houve uma grande falta de interesse em estudar compostos envolvendo o ródio e o rutênio devido à inércia cinética típica de seus centros metálicos, que faz com que sua capacidade de promover algum impacto na viabilidade celular seja baixa. Os autores explicam por meio de exemplos ao longo da revisão que o princípio geral para a falta de reatividade

química de muitos desses complexos está relacionada com os ligantes, que podem ser substituídos para potencializar ou reduzir o efeito citotóxico.

6.2.3 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na formação de micronúcleos em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1

A genotoxicidade do complexo foi avaliada por meio do ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese. Neste método, as células que completaram a divisão nuclear são identificadas por sua aparência binucleada após a inibição da formação do anel de microfilamentos de actina necessário para a citocinese, dessa forma, um dos parâmetros avaliados na investigação dos efeitos genotóxicos de uma substância é o índice de divisão nuclear (IDN) (FENECH, 2020). De acordo com Michael Fenech (2007), os resultados podem variar de acordo com as condições de cultura, o nível de exposição a agentes genotóxicos ou citotóxicos, composição do meio de cultura e as células que estão sendo utilizadas e o valor considerado ideal para IDN está entre 1,3 e 2,2.

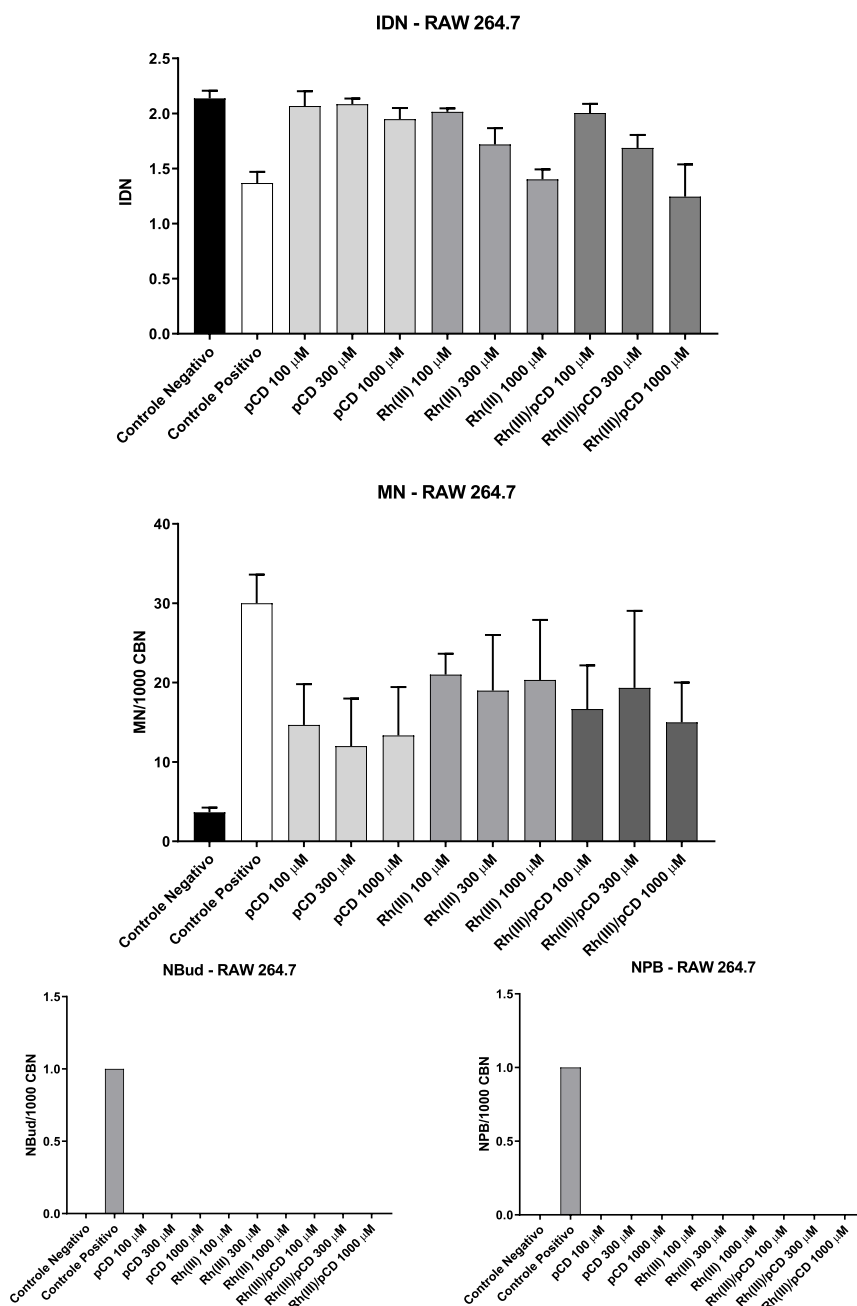
Micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPBs) e brotos nucleares (NBuds) são biomarcadores de instabilidade cromossômica e efeitos genotóxicos (FENECH *et al.*, 2011), portanto, quando detectados em quantidades elevadas, são preditivos de danos ao material genético das células. MN são originados de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que ficam para trás na anáfase durante a divisão nuclear e sua formação pode ser resultado de processos naturais como metabolismo ou envelhecimento, bem como de exposição a fatores ambientais como agentes químicos (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020). As NPBs surgem a partir de cromossomos dicêntricos causados por fusões terminais dos telômeros, de reparo incorreto de quebras do DNA ou da falha na separação completa das cromátides. Ao passo que os NBuds resultam de um mecanismo pelo qual os núcleos eliminam genes amplificados e complexos de reparo de DNA não resolvidos (FENECH, 2020).

A definição de resultados positivos ou negativos de genotoxicidade é baseada nos critérios previstos em protocolos internacionais como o *OECD guideline for the testing of chemicals - TG 487 - in vitro mammalian cell micronucleus test*. No presente estudo os controles positivo e negativo estão de acordo com tais critérios, bem como valores de IDN, que se mostraram dentro da faixa ideal preconizada para todas as

substâncias testadas nas suas diferentes concentrações em ambas as linhagens de macrófagos analisadas (FENECH, 2007; OECD, 2016).

Nas figuras 15 e 16, que apresentam os resultados das análises de genotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1, é possível observar que não houve aumento significativo da ocorrência de micronúcleos em nenhuma das concentrações testadas tanto dos compostos puros quanto do complexo. Além disso não foi encontrada diferença significativa entre os compostos puros e o complexo.

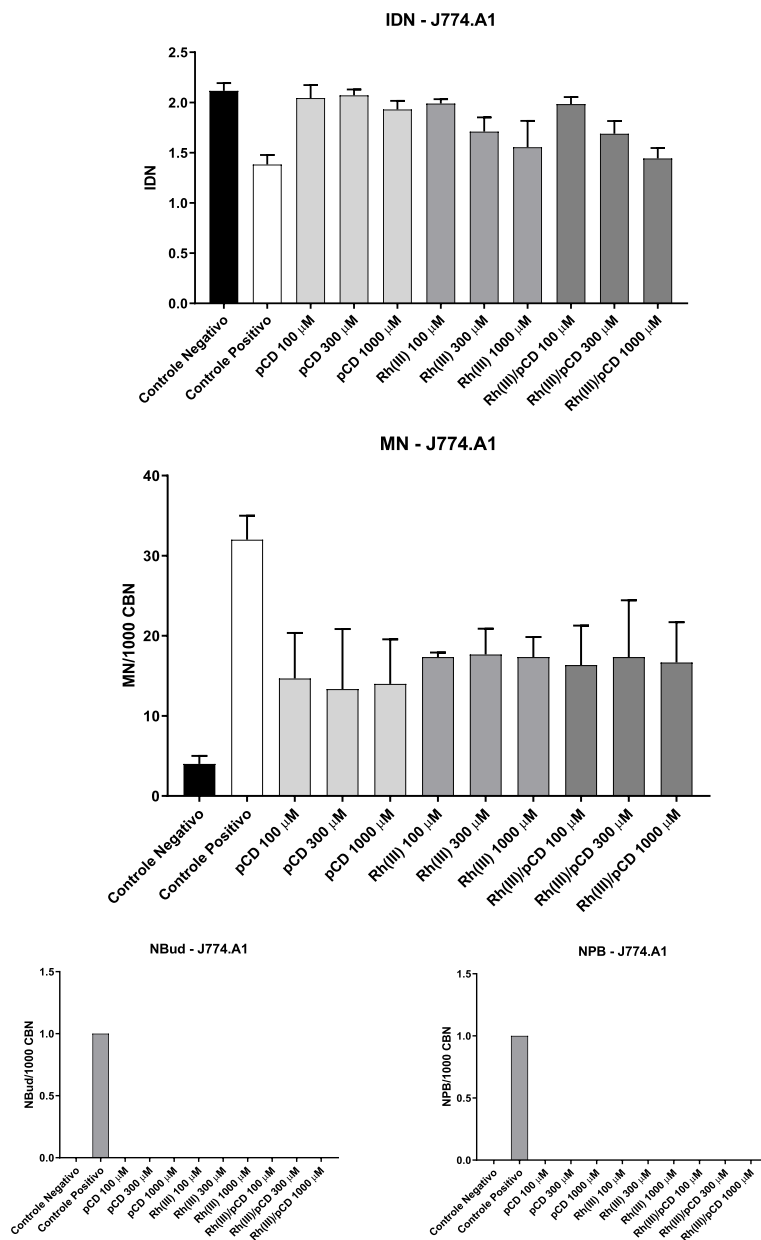
Figura 15 - Formação de micronúcleos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: pCD: policiclodextrina; Rh(III): cloreto de ródio (III); Rh(III)/pCD complexo de coordenação de ródio com policiclodextrina; IDN: índice de divisão nuclear; MN: micronúcleo; CBN: célula binucleada; NBud: brotos nucleares; NPB: ponte nucleoplasmáticas; MN/1000 CBN: micronúcleo por 1000 células binucleadas; NBud/1000 CBN: brotos nucleares por 1000 células binucleadas; NPB/1000 CBN: ponte nucleoplasmáticas por 1000 células binucleadas.

Figura 16 - Formação de micronúcleos em macrófagos da linhagem J774.A1 tratadas com diferentes concentrações de Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: pCD: policiclodextrina; Rh(III): cloreto de ródio (III); Rh(III)/pCD complexo de coordenação de ródio com policiclodextrina; IDN: índice de divisão nuclear; MN: micronúcleo; CBN: célula binucleada; NBud: brotos nucleares; NPB: ponte nucleoplasmáticas; MN/1000 CBN: micronúcleo por 1000 células binucleadas; NBud/1000 CBN: brotos nucleares por 1000 células binucleadas; NPB/1000 CBN: ponte nucleoplasmáticas por 1000 células binucleadas.

De acordo com a literatura, a frequência esperada de pontes núcleo plasmáticas varia entre 0 e 10, enquanto a de brotos nucleares está entre 0 e 5 por 1000 células binucleadas (FENECH, 2007). No presente estudo não foi observada a presença desses marcadores em nenhuma das linhagens testadas.

Não foram encontrados dados na literatura de outros estudos que aplicaram o teste de micronúcleo em macrófagos para investigar os efeitos genotóxicos do ródio ou do complexo com policiclodextrina.

Migliore e colaboradores (2002) estudaram os possíveis efeitos genotóxicos do ródio em linfócitos humanos utilizando diferentes concentrações e apresentaram média de 21,1; 25,5 e 23,5 para as concentrações de 100, 250 e 1000 μM respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos dados obtidos no presente estudo onde os macrófagos RAW 264.7 apresentaram média de 20,8; 18,8 e 20,2 e os J774.A1 apresentaram média de 21,7; 20,0 e 19,5 nas concentrações de 100, 300 e 1000 μM respectivamente.

O trabalho de Lebedová e colaboradores (2017) investigou o potencial genotóxico de diferentes nanopartículas, dentre elas da platina, e concluiu que o metal em questão não promoveu dano ao material genético de em células epiteliais brônquicas humanas.

Ao avaliar a genotoxicidade do complexo a base de rutênio do tipo $\text{Na}[\text{RuCl}_2\text{L}_2]$ Ljubijankić e colaboradores (2018) observaram diminuição da ocorrência de micronúcleos em linfócitos humanos após tratamento (LJUBIJANKIĆ *et al.*, 2018).

Recentemente, Teixeira e colaboradores (2021) sintetizaram dois diferentes complexos à base de rutênio e utilizaram o ensaio de micronúcleo para avaliação da citotoxicidade em células tumorais. De acordo com os autores, os complexos se apresentam promissores quanto à segurança toxicológica.

Diante do exposto é possível sugerir que tanto o Rh(III) , quanto o complexo Rh(III)/pCD não apresentam potencial genotóxico para macrófagos das linhagens de macrófago RAW 264.7 e J774.A1 nas concentrações de 100, 300 e 1000 μM .

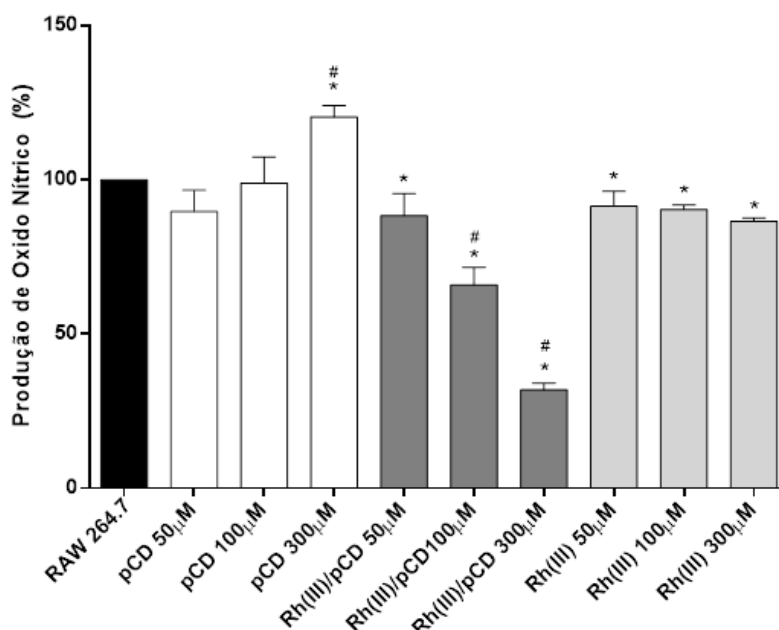
6.2.4 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1

Como ressaltado anteriormente, o NO é um importante agente mediador de processos envolvidos na resposta inflamatória como a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo, agregação plaquetária e adesão leucocitária. Estímulos inflamatórios como o LPS podem desencadear a produção de NO pela enzima iNOS resultando na produção de intermediários reativos de NO que estimulam o estado pró-inflamatório. É de grande conhecimento que a produção exacerbada de NO está relacionada com diversas doenças inflamatórias como aterosclerose, artrite reumatoide e outras, o que reforça a importância do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos capazes de modular essa produção (LEUNG *et al.*, 2013).

Para investigar os possíveis efeitos do complexo de Rh(III)/pCD, a inibição da produção de NO foi avaliada indiretamente pela dosagem de nitrito em macrófagos RAW 264.7 (Figura 17) e J774.A1 (Figura 18) através do método colorimétrico de Griess.

Nos resultados obtidos foi possível observar que o tratamento com Rh(III)/pCD, quando comparado ao controle não tratado, reduziu significativamente a produção de NO em RAW 264.7 em todas as concentrações testadas. Além disso, nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M a redução de NO induzida pelo complexo foi mais significativa do que a redução induzida pelo Rh(III) puro.

Figura 17 - Avaliação da inibição da produção de NO pelo Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 h de cultura.

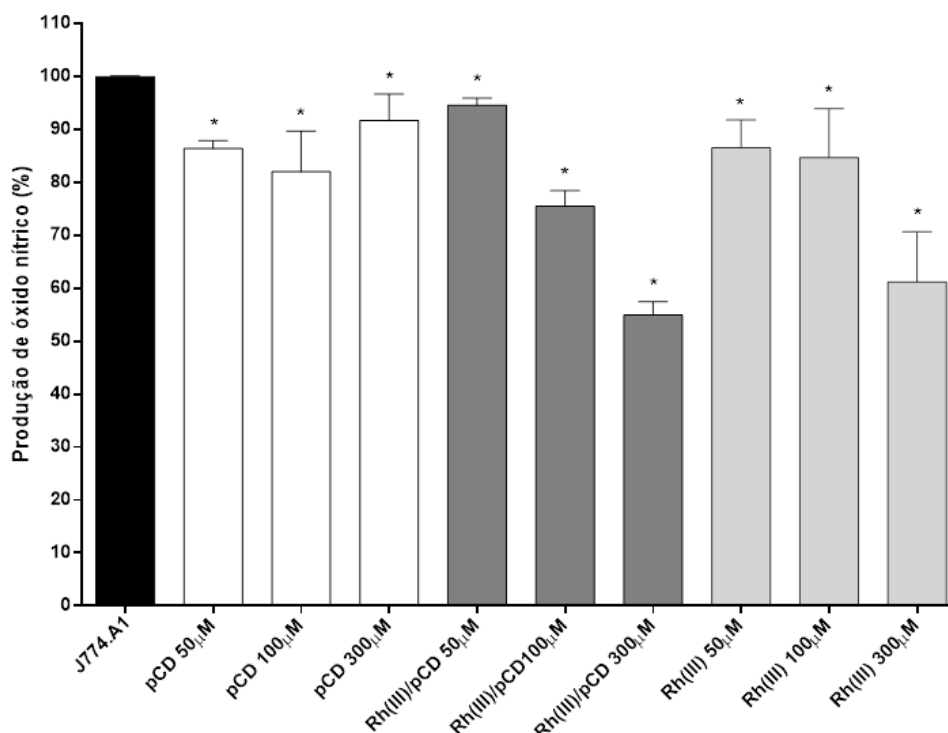


FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: Rh(III)/pCD: complexo de coordenação do ródio (III) com policiclodextrina, pCD: policiclodextrina; e Rh(III): cloreto de ródio (III), * $p < 0,05$ quando comparado à RAW 264.7. # $p < 0,05$ quando comparado ao Rh(III) na mesma concentração. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Em J774A.1 todos os tratamentos reduziram a produção de NO de forma diferente ao controle (célula estimulada, porém não tratada). Nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M, o complexo se mostrou melhor que o Rh(III) puro ao reduzir a produção de NO, apesar de não ter apresentado diferença estatística dentro do intervalo de confiança utilizado (Figura 18).

Figura 18 - Avaliação da inibição da produção de NO pelo Rh(III), pCD e Rh(III)/pCD em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- γ , após 48 h de cultura.



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: Rh(III)/pCD: complexo de coordenação do ródio (III) com policiclodextrina, pCD: policiclodextrina; e Rh(III): cloreto de ródio (III), * $p < 0,05$ quando comparado à J774A.1. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos que investigam as atividades biológicas dos metais de transição, dentre eles o ródio, em complexos organometálicos. Como citado anteriormente, grande parte desses estudos está focada nos efeitos antitumorais e poucos são os resultados apresentados com relação a outros efeitos, como por exemplo a imunomodulação.

Os complexos de ródio recebem grande destaque em estudos que o apresentam com atividade anticâncer interessante para inibir algumas enzimas e proteínas não enzimáticas, como demetilases, quinases e oxidases, além de mediadores inflamatórios (KANG *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2018; SOHRABI *et al.*, 2021).

A redução significativa da produção de NO em RAW 264.7 aqui observada evidencia o potencial imunomodulador do complexo Rh(III)/pCD. Esses resultados são corroborados por Liu e colaboradores (2014) que, em seus experimentos desenvolveram o complexo $[\text{Rh}(\text{bzq})_2(4,7\text{-Clphen})]\text{PF}_6$, capaz de reduzir a produção

de NO induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. Seus dados mostram que a inibição pelo complexo foi de 80%, ao passo que o controle por eles utilizado inibiu 50% da produção. Após essa constatação o grupo realizou uma análise de dose-resposta na qual as células foram tratadas com LPS (1,0 µg/mL) e o complexo (10,0 µM) ou veículo controle por 24 h, e o nível de acúmulo de nitrito no meio de cultura foi medido pelo método de Griess. Essa etapa mostrou que o complexo inibiu a produção de nitrito induzida por LPS de uma forma dependente da dose (LIU *et al.*, 2014).

A redução da produção de NO induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7 também foi observada por um grupo de pesquisa da Universidade de Valência, na Espanha em estudo no qual foi desenvolvido um complexo ciclometalado de ródio binuclear com moléculas liberadoras de monóxido de carbono (MORAGUES *et al.*, 2013).

Outras evidências do potencial imunomodulador do ródio estão presentes no trabalho de Papakonstantinou e colaboradores (2017), que desenvolveram uma série de complexos a base de Rh(III) e constataram sua capacidade de inibir o fator de ativação plaquetária (PAF) e a trombina. Segundo os autores, os complexos sintetizados são promissores candidatos a agentes antitrombóticos, anticâncer e anti-inflamatórios, fundamentados no fato de que tanto a trombina quanto o PAF estão envolvidos no contexto inflamatório em tecidos tumorais e de que o excesso de PAF favorece o estado pró-inflamatório.

A proteína JMJD3 é uma histona demetilase envolvida em eventos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose. Essa proteína é induzida em processos oncogênicos, infecções virais e em processos inflamatórios. Macrófagos estimulados por LPS expressam JMJD3, que promove o aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral. Dessa forma, um agente inibidor de JMJD3 se torna uma importante ferramenta na modulação da resposta imune. Com base nessas informações e em estudos acerca das atividades biológicas dos metais de transição, Kang e colaboradores (2018) sintetizaram diferentes complexos ciclometalados à base de irídio e ródio e identificaram que um dos complexos à base de Rh(III) (por eles nomeado complexo 1) atua como antagonista de JMJD3. Em seguida os autores constataram a inibição da produção de TNF-α em macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS, demonstrando assim o potencial imunomodulador do complexo de ródio (III) testado.

Zhong e colaboradores (2017) investigaram os efeitos biológicos do ródio em modelo de doença inflamatória intestinal. Eles desenvolveram um complexo de Rh(III) inibidor de NAE, uma enzima envolvida nos processos de ubiquitinação e degradação de proteínas relacionadas à inflamação, como I κ B α e p27, e o apresentaram como um promissor agente anti-inflamatório para tratamento da doença inflamatória intestinal.

Um ponto importante a ser frisado é que no presente estudo o tratamento com o complexo Rh(III)/pCD, nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M, promoveu a redução de NO nos macrófagos RAW 264.7 de forma mais acentuada do que o tratamento com Rh(III) puro. Nas células da linhagem J774.A1 não ocorreu essa diferença, o que pode ser justificado pelo fato de que, como citado anteriormente, diferentes linhagens de células podem apresentar respostas heterogêneas mesmo quando submetidas às mesmas condições (JUNIOR *et al.*, 2014; CABRAL *et al.*, 2018).

Os polímeros de ciclodextrinas têm sido empregados com sucesso em muitas áreas de pesquisa e diversas aplicações industriais como tratamento de água, ciência ambiental, aditivos alimentares, indústria têxtil, cosméticos, engenharia de tecidos e distribuição de fármacos. A literatura dispõe de vários estudos que apontam a utilização desses polímeros na síntese de diferentes complexos com o intuito de melhorar características como solubilidade, biodisponibilidade, afinidade de ligações, absorção e tempo de liberação das moléculas de interesse (HEYDARI *et al.*, 2017; CRINI, 2020; LIU *et al.*, 2020; CRINI, 2021). Com base nesses estudos é possível inferir que a complexação com a policiclodextrina seja a razão pela qual o complexo Rh(III)/pCD apresentou atividade superior à do Rh(III) puro.

O trabalho de Liu e colaboradores (2020) corrobora com os resultados aqui apresentados. Eles sintetizaram um complexo do antibiótico ornidazol com policiclodextrina (1:1) e constataram que a pCD promoveu melhora no tempo de liberação do fármaco. Dessa forma, concluíram que o complexo pode ser benéfico para a liberação do fármaco no intestino e que, conseqüentemente, pode ser usado para desenvolver um novo sistema de distribuição de ornidazol.

Gefitinib é um medicamento de ação citotóxica que impede o crescimento e a disseminação das células tumorais. Ele foi aprovado pelo FDA em 2003 e desde então é utilizado no tratamento de tumores sólidos, entretanto é uma substância de baixa solubilidade. Gidwani, Vyas e Deep Kaur (2018) contornaram essa limitação ao complexarem o fármaco com moléculas de pCD – seus resultados revelaram que, no complexo, a droga não existe mais no estado cristalino e é convertida na forma

amorfa, que mostra maior taxa de dissolução em comparação com o fármaco cristalino. Eles concluem que a complexação do Gefitinib com pCD é uma ferramenta adequada para resolver a questão relacionada à sua entrega e pode ser explorada para o desenvolvimento de um sistema de entrega eficaz.

Outro exemplo de melhora das características físico-químicas promovida pela policiclodextrina é o resultado publicado por Heydari e colaboradores (2017) no trabalho em que avaliaram perfil de liberação, estabilidade térmica e solubilidade do complexo nifedipino/pCD. Nifedipino (NIF) é um fármaco utilizado no tratamento de hipertensão arterial que apresenta baixa solubilidade em água e reduzido tempo de permanência na circulação plasmática.

Os testes *in vitro* de liberação do NIF foram realizados em pH semelhante ao gástrico (1,2), intestinal (7,4) e em pH alcalino (10) e mostraram, respectivamente, 42%, 50% e 83% de liberação de NIF do complexo no período de 30 h, sugerindo que a pCD fornece uma liberação controlada de NIF dependente do pH ao longo do tempo. A maior estabilidade térmica do complexo em relação aos seus precursores foi comprovada por meio da técnica DSC, e, ao comparar a solubilidade de NIF com a dos complexos NIF/ β CD e NIF/pCD, os autores observaram melhor resultado do complexo formado com pCD, atribuindo essa melhoria à estrutura poli funcional dos polímeros de ciclodextrina (HEYDARI *et al.*, 2017).

Estes e outros trabalhos disponíveis na literatura endossam os resultados apresentados no presente estudo que permitem sugerir que a policiclodextrina potencializou a atividade biológica do Rh(III) na inibição da produção de NO induzida por LPS em macrófagos.

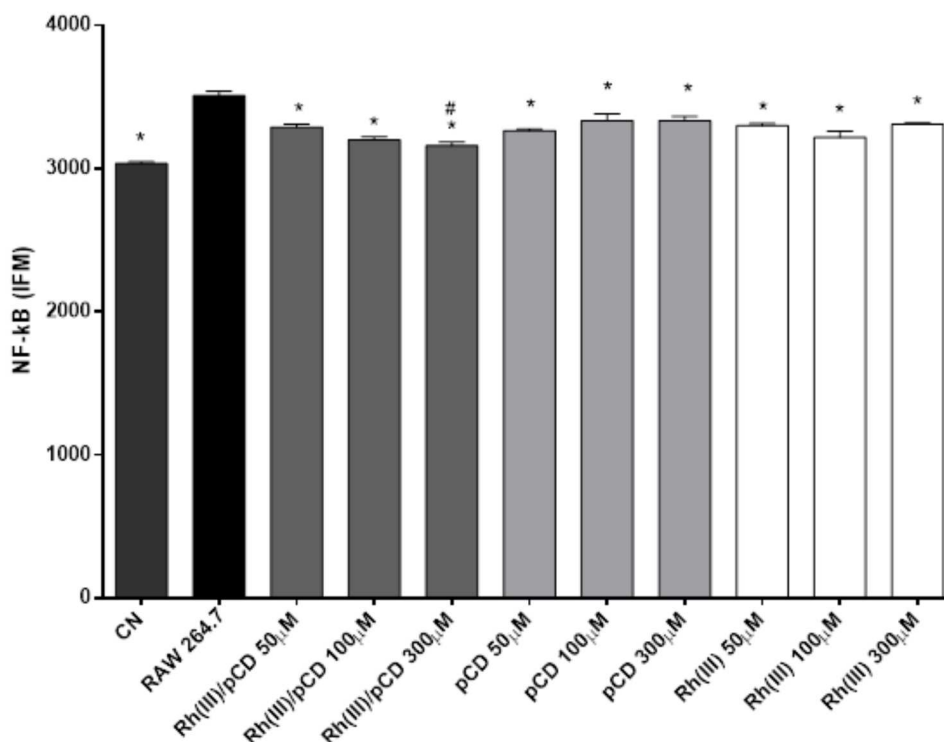
6.2.5 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD na expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1

Sabe-se que a inflamação é fundamental para o início da imunidade protetora, contudo, a resposta inflamatória exacerbada pode causar danos ao tecido e promover o desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes. Tendo em vista que a ativação do NF- κ B é uma etapa fundamental para a ativação de mediadores inflamatórios, a inibição das vias desse fator de transcrição tem sido o foco de muitas pesquisas ao longo dos últimos anos (AFONINA *et al.*, 2017).

O presente estudo avaliou os efeitos na expressão de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 estimulados com LPS e IFN- γ após 3 h do tratamento com Rh(III)/pCD. Os resultados representam a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) obtida através de citometria de fluxo, uma técnica que permite a avaliação de diferentes características celulares como conteúdo genético, receptores de superfície, atividade enzimática e produção de citocinas. O princípio da técnica é a detecção de fluorocromos acoplados em anticorpos, capazes de se ligar às moléculas de interesse presentes na célula (O'NEILL *et al.*, 2013).

Na figura 19 é possível observar, por meio da diminuição da intensidade de fluorescência, que o complexo Rh(III)/pCD promoveu a redução expressão de NF- κ B nos macrófagos RAW 264.7 após 3 h de tratamento em todas as concentrações testadas de forma significativa em relação ao controle, células RAW 264.7 estimuladas, porém não tratadas.

Figura 19 - Mediana da intensidade de fluorescência da expressão de NF- κ B por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , após 3 h de tratamento com Rh(III)/pCD, pCD e Rh(III)



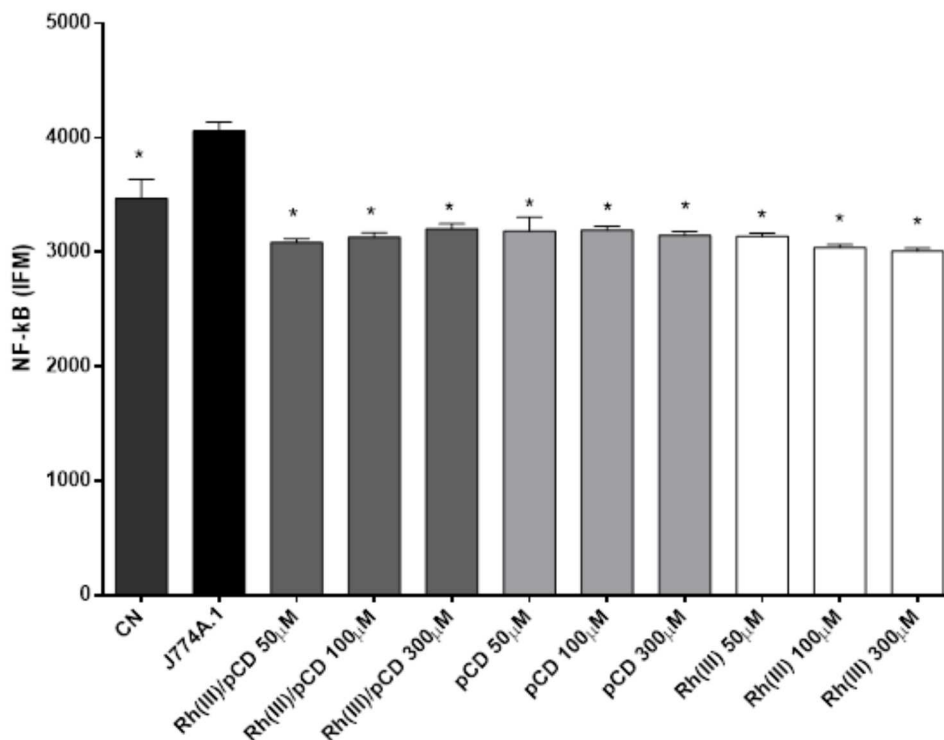
FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: Rh(III)/pCD: Rh(III)/pCD: complexo de coordenação do ródio (III) com policiclodextrina, pCD: policiclodextrina; Rh(III): cloreto de ródio (III); CN: controle negativo; NF- κ B: fator nuclear kappa B; IFM: mediana da intensidade de fluorescência. * $p < 0,05$ RAW 264.7 *versus* controle negativo (CN) ou Rh(III)/pCD ou pCD ou Rh(III); # $p < 0,05$ Rh(III)/pCD *versus* Rh(III) na mesma concentração. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A figura 19 evidencia ainda que o tratamento com Rh(III)/pCD inibiu a expressão de NF- κ B de forma mais acentuada do que o tratamento com Rh(III) na concentração de 300 μ M, evidenciando mais uma vez a vantagem de se complexar o composto com pCD.

Os efeitos dos tratamentos nos macrófagos J774.A1 estão representados pela figura 20, na qual é possível observar a redução da mediana da intensidade de fluorescência, refletindo a redução da expressão de NF- κ B por essas células em todas as concentrações testadas após o período de 3 h.

Figura 20 - Mediana da intensidade de fluorescência da expressão de NF- κ B por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- γ , após 3 h de tratamento com Rh(III)/pCD, pCD e Rh(III).



FONTE: Elaborada pela autora (2021)

Legenda: Rh(III)/pCD: Rh(III)/pCD: complexo de coordenação do ródio (III) com policiclodextrina, pCD: policiclodextrina; Rh(III): cloreto de ródio (II); CN: controle negativo; NF- κ B: fator nuclear kappa B; IFM: mediana da intensidade de fluorescência. * $p < 0,05$ J774.A1 *versus* controle negativo (CN) ou Rh(III)/pCD ou pCD na mesma concentração. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Os resultados aqui apresentados, que comprovaram a capacidade do complexo Rh(III)/pCD reduzir a expressão do fator de transcrição NF- κ B nas linhagens de macrófagos RAW 264.7 e J774.A1 estimulados com LPS e IFN- γ , estão em concordância com os dados apresentados por Liu e colaboradores (2014) que, ao sintetizar e avaliar os efeitos biológicos do complexo à base de Rh(III) desenvolvido por eles, constatou também a inibição da atividade transcricional do NF- κ B em macrófagos RAW 264.7.

Poucos trabalhos disponíveis na literatura expressam resultados semelhantes, como o de Kang e colaboradores (2017) que sintetizaram um complexo à base de Rh(III) e, ao avaliar seus efeitos em células de melanoma humano da linhagem A2058, identificaram que as células tratadas com o complexo apresentaram inibição das vias

STAT3 e NF- κ B. A redução da sinalização do NF- κ B foi relatada por Zhong e colaboradores (2017) em macrófagos RAW 264.7 após tratamento com dois complexos metálicos à base de ródio desenvolvidos por eles.

Não foram encontrados outros estudos que avaliaram os efeitos do Rh(III) complexados com policiclodextrinas na expressão de NF- κ B. Outros metais do grupo da platina também já foram apontados como potenciais inibidores de NF- κ B. Recentemente Jayakumar e colaboradores (2020) publicaram os resultados do trabalho no qual sintetizaram três diferentes complexos à base de rutênio para avaliar sua atividade anti-inflamatória em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Após os tratamentos eles concluíram que um dos complexos foi capaz de reduzir a produção de NO e a expressão de NF- κ B.

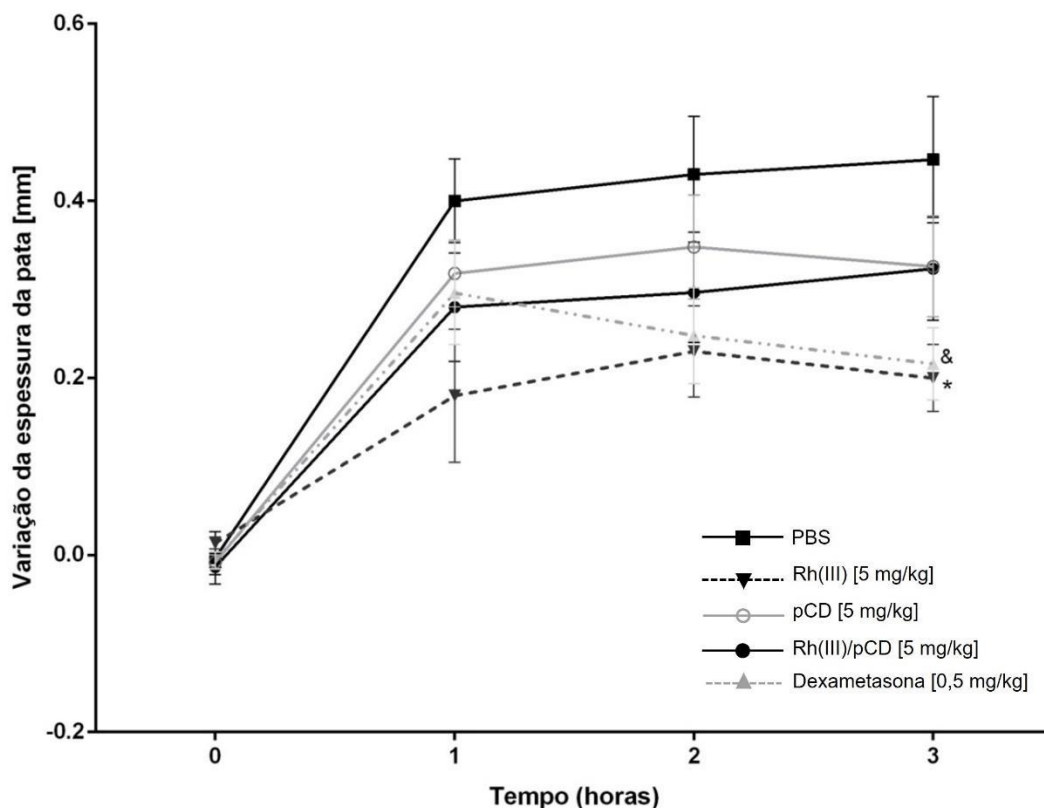
De forma semelhante ao ensaio de avaliação da produção de NO, observou-se aqui que o complexo Rh(III)/pCD apresenta desempenho superior ao Rh(III) puro, o que nos permite novamente inferir, com base em outros trabalhos presentes na literatura (HEYDARI *et al.*, 2017; GIDWANI; VYAS; DEEP KAUR, 2018; LIU *et al.*, 2020), que a policiclodextrina potencializou a atividade biológica do Rh(III).

6.2.6 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD em modelo *in vivo* de indução de edema de pata em camundongos pela inoculação de carragenina

Diante dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, que revelaram a potencial atividade imunomoduladora do complexo Rh(III)/pCD, objetivou-se investigar seus efeitos *in vivo*. Para isso foi utilizado o modelo de indução de edema de pata em camundongos induzido por carragenina, uma substância que estimula a liberação de mediadores inflamatórios e faz com que sinais da inflamação como o edema se desenvolvam imediatamente após sua injeção subcutânea. Como dito anteriormente, esse modelo é amplamente utilizado por ser bastante conhecido e apresentar elevado grau de reprodutibilidade (CINELLI *et al.*, 2020).

O resultado está expresso pela figura 21, que mostra a variação da espessura do edema induzido pela carragenina nas patas dos camundongos após 3 h de tratamento intraperitoneal com os compostos.

Figura 21 - Variação da espessura do edema em patas de camundongos BALB/c após 3 h de tratamento intraperitoneal com o Rh(III), pCD, Rh(III)/pCD, dexametasona e com PBS.



FONTE: a autora (2021)

Legenda: Rh(III): cloreto de ródio (III), pCD: polyclodextrina, Rh(III)/pCD: complexo de coordenação de Rh(III) com polyclodextrina, PBS: tampão fosfato salino, mm: milímetros. & $p < 0,05$ dexametasona *versus* PBS. * $p < 0,05$ Rh(III) *versus* PBS. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A medida das patas dos animais mostrou que, após o período de 3 h de tratamento intraperitoneal (100 μ L) com Rh(III) [5 mg/Kg], pCD [5 mg/Kg], Rh(III)/pCD [5 mg/Kg], dexametasona [0,5 mg/Kg] e com PBS, o Rh(III) puro foi capaz de reduzir o edema em valores semelhantes ao obtido com a dexametasona. O complexo Rh(III)/pCD também apresentou capacidade de reduzir o edema, entretanto, não atingiu efeito estatisticamente diferente do PBS, utilizado como controle positivo.

A redução do edema de pata apresentada pelo complexo permite inferir sua superioridade em relação ao cloreto de ródio puro devido à complexação com a pCD. Isso se deve ao fato de que foram utilizadas as mesmas dosagens no valor de 5 mg/kg para ambos os compostos e, considerando essa massa (em mg/kg), a quantidade de íons de ródio é bem menor no complexo (%Rh(III) = 8,31%) do que no RhCl_3 (%Rh(III)

= 49,17%). Assim, pode-se dizer que na presença de pCD gasta-se bem menos Rh(III) para se produzir um efeito similar.

Nas últimas décadas, a pesquisa da química medicinal tem sido focada nas propriedades antitumorais dos complexos de metais de transição, especialmente daqueles baseados em platina e rutênio. Em comparação, os estudos acerca da atividade anti-inflamatória dos complexos metálicos recebem atenção muito menor.

Ao longo do presente estudo citamos alguns trabalhos desenvolvidos que destacam o potencial dos complexos de metais de transição na modulação das vias inflamatórias. Entretanto, não foram encontrados dados relacionando os complexos de coordenação do Rh(III) em modelos *in vivo*, salvo o trabalho de Zhong e colaboradores (2017). Esses autores estudaram um modelo *in vivo* de doença inflamatória intestinal e evidenciaram promissor efeito anti-inflamatório do complexo ciclometalado de Rh(III) por eles desenvolvido.

Agarwal, Nakara e Shanmugan (2019) publicaram recentemente uma revisão na qual apresentam 11 diferentes trabalhos em que foram estudados complexos formados por extratos de plantas e metais. Nessa mesma revisão são apresentados ainda outros modelos de inflamação *in vivo* comprovando a atividade anti-inflamatória dos complexos metálicos, entretanto, não foram citados trabalhos envolvendo Rh (III).

Frente aos resultados obtidos no ensaio de inflamação aguda e tendo em vista que, como mencionado anteriormente, as ciclodextrinas tem a capacidade de melhorar a solubilidade de fármacos a ela complexados e melhorar sua estabilidade (BOURKAIB *et al.*, 2013; NAMGUNG *et al.*, 2014; JACOB; NAIR, 2018; TIAN; HUA; LIU, 2020), o presente estudo demonstra-se inédito em mostrar efeitos Rh(III), em um modelo de inflamação aguda, além da superioridade do seu complexo com policiclodextrina no efeito anti-inflamatório.

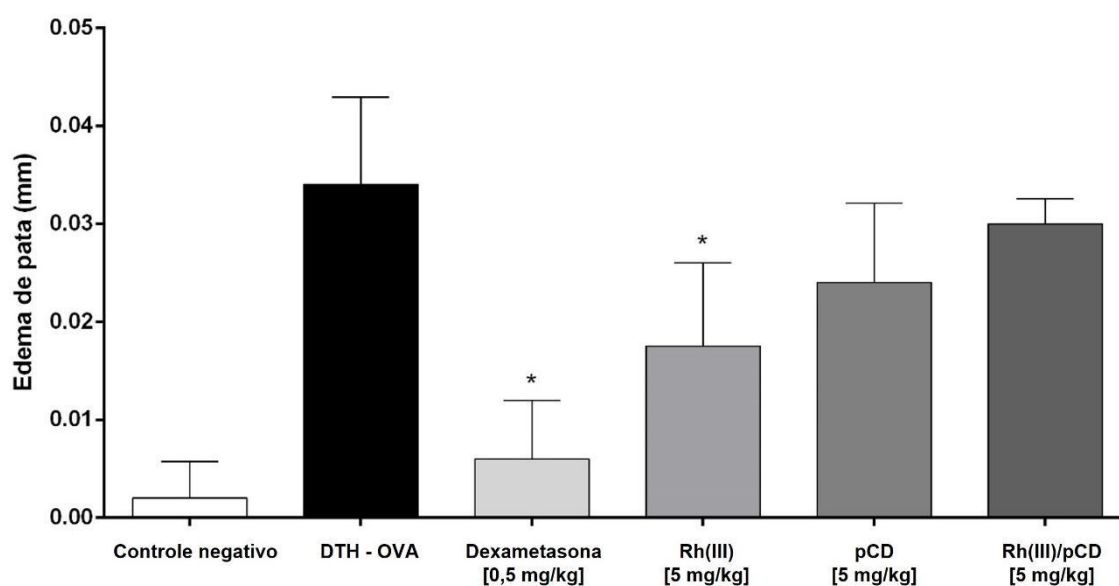
6.2.7 Efeitos do complexo Rh(III)/pCD em modelo *in vivo* de hipersensibilidade tardia em camundongos pela inoculação de ovalbumina

Delayed type hypersensitivity (DTH), ou hipersensibilidade do tipo tardia é uma resposta inflamatória mediada por linfócitos T e tem como característica marcante o grande influxo de células inflamatórias, principalmente os macrófagos (PALLARDY; BECHARA, 2017). O processo envolve uma fase inicial de sensibilização após o contato com o antígeno que pode variar em torno de sete dias, período no qual são

ativadas células T. Na fase efetora ocorre a liberação de citocinas que ativam os macrófagos e outras células inflamatórias inespecíficas. Em geral, a resposta começa a ser evidenciada a partir de 24 h e tem seu pico entre 48 e 72 h (ROACH; STEFANIAK; ROBERTS, 2019; ZHANG *et al.*, 2009).

A reação de hipersensibilidade tardia foi analisada 48 h após a inoculação de ovalbumina e os resultados estão representados na figura 22.

Figura 22 - Variação da espessura do edema em patas de camundongos BALB/c após 48 h do desafio com ovalbumina.



Fonte: a autora (2022)

Legenda: DTH – OVA: ovalbumina; Rh(III): cloreto de ródio (III); pCD: policiclodextrina; Rh(III)/pCD: complexo de coordenação de ródio com policiclodextrina.

É possível observar no gráfico que o tratamento com Rh(III) [5 mg/Kg] foi capaz de promover a redução do edema de pata de forma significativa semelhante à dexametasona. O resultado corrobora com o ensaio de edema de pata induzido por carragenina, mostrando também uma redução do edema pelo complexo Rh(III)/pCD, embora sem diferença estatisticamente significativa.

Ao apresentar a capacidade dos compostos em reduzir o edema de pata, dessa vez em modelo de inflamação tardia, tem-se aqui mais uma evidência de que o complexo se mostrou superior ao ródio puro pelo mesmo princípio citado anteriormente. O tratamento com Rh(III)/pCD (%Rh(III) = 8,31%) na mesma dosagem

do tratamento com Rh(III) (%Rh(III) = 49,17%), utilizando a massa de 5mg/kg, resultou em uma redução do edema, com quantidade de Rh(III) quase cinco vezes menor que no tratamento com o cloreto de ródio puro, permitindo inferir que a atividade do ródio foi aprimorada pela pCD.

Com a crescente utilização de nanopartículas metálicas na área biomédica, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para avaliar seus efeitos no sistema imunológico (HIGASHISAKA *et al.*, 2017, HIRAI, T. *et al.*, 2016; CRANE, 2020), entretanto, ainda são muito escassos os dados a respeito de uma possível atividade anti-inflamatória. Não foram encontrados na literatura estudos semelhantes envolvendo complexos à base de ródio.

Utilizando o modelo experimental de DTH em camundongos, Jan e colaboradores (2012) observaram que nanopartículas de óxido de ferro puro, por meio de administração dose-dependente, possuem a capacidade de atenuar reações inflamatórias incluindo edema de pata.

O trabalho de Kim e colaboradores (2014) corrobora com os dados aqui apresentados. Eles investigaram a imunotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco por meio do modelo de DTH e em seus resultados relataram uma melhora na resposta dos animais após 48 h de tratamento com o complexo por eles sintetizado, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

É importante ressaltar que os efeitos imunológicos dos metais estão relacionados à sua capacidade de alterar as interações entre células e moléculas em nível bioquímico e dependem criticamente de suas propriedades físico-químicas como estado de oxidação e solubilidade (KINBARA *et al.*, 2011).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo objetivou sintetizar, caracterizar e avaliar as atividades biológicas do complexo de coordenação Rh(III)/pCD. A caracterização estrutural, realizada por meio de diferentes métodos como espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e titulação calorimétrica isotérmica, atestou a coordenação dos compostos.

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade mostraram que tanto o complexo, quanto o Rh(III) puro não promovem danos celulares incompatíveis com a viabilidade celular e com a integridade do seu material genético.

As análises de atividades biológicas revelaram o potencial imunomodulador do complexo sintetizado e de seus compostos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi observada redução na produção de óxido nítrico, um importante agente mediador de processos envolvidos na resposta inflamatória, em macrófagos das linhagens RAW 264.7 e J774.A1 estimuladas por LPS.

O complexo Rh(III)/pCD, nas concentrações de 100 μM e 300 μM , apresenta atividade superior ao Rh(III) puro ao reduzir a produção de NO em macrófagos RAW 264.7.

Outra atividade imunomoduladora demonstrada no presente estudo foi a redução da expressão de NF- κB em ambas as linhagens de macrófagos testadas (RAW 264.7 e J774.A1). O complexo Rh(III)/pCD se mostrou superior ao Rh(III) puro na concentração de 300 μM ao reduzir a expressão de NF- κB em macrófagos RAW 264.7.

Os modelos *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina e por ovalbumina mostraram que o ródio foi capaz de promover a diminuição do edema de forma semelhante à dexametasona e que o complexo Rh(III)/pCD é capaz de promover a redução do edema com uma quantidade cinco vezes menor de ródio, o que revelou o potencial da pCD em otimizar a atividade do Rh(III) após a formação do complexo.

Diante dos resultados aqui apresentados, o presente trabalho fornece diferentes evidências para sugerir o potencial efeito imunomodulador do Rh(III) e do seu complexo de coordenação Rh(III)/pCD além da capacidade da policiclodextrina de melhorar as características físico-químicas das moléculas às quais ela é complexada.

Maiores estudos devem ser realizados para avaliar quais as vias estão envolvidas na atividade anti-inflamatória dos complexos de coordenação à base de ródio para viabilizar a exploração do seu potencial.

8 REFERÊNCIAS

- AFONINA, I. S. *et al.* Limiting inflammation—the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 861–869, ago. 2017.
- AGARWAL, H.; NAKARA, A.; SHANMUGAM, V. K. Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2561–2572, jan. 2019.
- AGUILERA-CORREA, J. J.; ESTEBAN, J.; VALLET-REGÍ, M. Inorganic and Polymeric Nanoparticles for Human Viral and Bacterial Infections Prevention and Treatment. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 137, jan. 2021.
- AJAYAN, P. M. The nano-revolution spawned by carbon. **Nature**, v. 575, n. 7781, p. 49–50, nov. 2019.
- ALVES, F.; SILVA, P.; GUERRA, W. Metais do grupo da platina: história, propriedades e aplicações. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 119, p. 1–64, out-dez. 2010.
- AMMAR, H.; MAKRAM, T.; MOSALLAM, S. Effect of Polymers on the Physicochemical Properties and Biological Performance of Fenopropfen Calcium Dihydrate-Triacetyl- β -Cyclodextrin Complex. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 23, jul. 2017.
- ASLAN, B. *et al.* Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 904–913, dez. 2013.
- BAHUGUNA, A. *et al.* MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 8, abr. 2017.
- BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 109–139, mar. 2006.
- BENQUEREL, E.; DEMOPOULOS, G. P.; HARRIS, G. B. Speciation and separation of rhodium (III) from chloride solutions: a critical review. **Hydrometallurgy**, v. 40, n. 1–2, p. 135–152, jan. 1996.
- BINELLO, A. *et al.* Synthesis of cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 4, p. 2549–2557, fev. 2008.
- BJARNASON, I. *et al.* Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 500–514, fev. 2018.
- BLASER, H. *et al.* TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, abr. 2016.
- BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, mar. 2015.

BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin–guest interactions. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 11–12, p. 623–629, jun. 2012.

BOURKAIB, N. *et al.* Combination of β -cyclodextrin inclusion complex and self-microemulsifying drug delivery system for photostability and enhanced oral bioavailability of methotrexate: novel technique. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 6, p. 918–927, jun. 2013.

BOYLE, K. M.; BARTON, J. K. A Family of Rhodium Complexes with Selective Toxicity toward Mismatch Repair-Deficient Cancers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 16, p. 5612–5624, abr. 2018.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Corrigendum to “Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy” [Advanced Drug Delivery Reviews 56(2004)1649–1659]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 364, abr. 2009.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p. 206–219, mai 2010.

BUSTOS, E. *et al.* Electrochemical study of β -Cyclodextrin binding with ferrocene tethered onto a gold surface via PAMAM dendrimers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1010–1016, 2008.

CABRAL, G. R. DE A. *et al.* Inhibition of Nitric Oxide Production in Activated Macrophages Caused by *Toxoplasma gondii* Infection Occurs by Distinct Mechanisms in Different Mouse Macrophage Cell Lines. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1936, ago. 2018.

CARNEIRO, M. L. B. *et al.* Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 4, 2013.

CASTRO, S. B.R. *et al.* 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.

CHAI, F. *et al.* Poly-cyclodextrin functionalized porous bioceramics for local chemotherapy and anticancer bone reconstruction: poly-cyclodextrin functionalized porous bioceramics. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1130–1139, ago. 2014.

CHANDEL, P. *et al.* Rationally synthesized coumarin based pyrazolines ameliorate carrageenan induced inflammation through COX-2/pro-inflammatory cytokine inhibition. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 421–430, 2019.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, jan. 2018.

CHEN, P. *et al.* Magnetic targeted nanoparticles based on β -cyclodextrin and chitosan for hydrophobic drug delivery and a study of their mechanism. **RSC Advances**, v. 7, n. 46, p. 29025–29034, 2017.

CHIFOTIDES, H. T. *et al.* Unprecedented Head-to-Head Conformers of d (GpG) Bound to the Antitumor Active Compound Tetrakis (μ -carboxylato) dirhodium (II,II). **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 35, p. 10703–10713, set. 2003.

CINELLI, M. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158–189, jan. 2020.

COMALADA, M. *et al.* Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1010–1021, out. 2006.

CRACIUNESCU, G. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new Rh (I) complexes with sulfonamide derivatives. **Anticancer Res.**, v. 9, n. 3, p. 781–785, jun. 1989.

CRANE, J. K. Metal Nanoparticles in Infection and Immunity. **Immunological Investigations**, v. 49, n. 7, p. 794–807, jun. 2020.

CRINI, G. Cyclodextrin–epichlorohydrin polymers synthesis, characterization and applications to wastewater treatment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 2383–2403, jun. 2021.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, nov. 2014.

CRINI, G. Water-Insoluble Cyclodextrin-Epichlorohydrin Polymers. In: CRINI, G.; FOURMENTIN, S.; LICHTFOUSE, E. (Eds.). **The History of Cyclodextrins**. Cham: Springer International Publishing, v. 52, p. 345–394, 2020.

CRUVINEL, W. DE M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

DENADAI, Â. M. L. *et al.* A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity: Physicochemical Characterization. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283–291, 2006.

DUBICKI, L.; MARTIN, R. L. Metal-metal bond in binuclear rhodium (II) acetate monohydrate. **Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 673–675, mar. 1970.

ELMAN, N.M.; UPADHYAY, U.M. “Medical Applications of Implantable Drug Delivery Microdevices Based on MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems)”, **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.11, n.4, p.398-403, 2010.

EN ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009). **International Organization For Standardization**, Geneva, 2009.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, abr. 2009.

FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1203, out. 2020.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, mai 2007.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, jan. 2011.

FLORENTINO, I. F. *et al.* Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 35–44, set. 2017.

FUSCO, R. *et al.* Inhibition of inflammasome activation improves lung acute injury induced by carrageenan in a mouse model of pleurisy. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 8, p. 3497–3511, ago. 2017.

GAO, Y. *et al.* Self-Assembled Hydrogels Based on Poly-Cyclodextrin and Poly-Azobenzene Compounds and Applications for Highly Efficient Removal of Bisphenol A and Methylene Blue. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 11663–11672, set. 2018.

GARCÍA-ZUBIRI, Í. X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G.; ISASI, J. R. Thermal stability of solid dispersions of naphthalene derivatives with β -cyclodextrin and β -cyclodextrin polymers. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 1, p. 57–64, mai 2006.

GELDMACHER, Y.; OLESZAK, M.; SHELDRIK, W. S. Rhodium (III) and iridium (III) complexes as anticancer agents. **Inorganica Chimica Acta**, v. 393, p. 84–102, dez. 2012.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 130–137, fev. 2014.

GIDWANI, B.; VYAS, A.; DEEP KAUR, C. Investigation of inclusion behaviour of gefitinib with epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer: preparation of binary complex, stoichiometric determination and characterization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 160, p. 31–37, out. 2018.

GIL, E. DE S.; KUBOTA, L. T.; NAJJAR, R. Potencialidades da utilização de compostos de ródio na confecção de sensores eletroquímicos: uma breve revisão. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 755–760, nov. 1998.

HĂDĂRUGĂ, N. G.; BANDUR, G. N.; HĂDĂRUGĂ, D. I. Thermal Analyses of Cyclodextrin Complexes. In: FOURMENTIN, S.; CRINI, G.; LICHTFOUSE, E. (Eds.). **Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis**. Cham: Springer International Publishing, v. 16p. 155–221, 2018.

HANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1215–1233, ago. 2013.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell Research**, v. 21, n. 2, p. 223–244, fev. 2011.

HEYDARI, A. *et al.* Water-Soluble β -cyclodextrin Polymers as Drug Carriers to Improve Solubility, Thermal Stability and Controlled Release of Nifedipine. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 51, n. 5, p. 375–383, ago. 2017.

HEYDARI, A. *et al.* β -Cyclodextrin-epichlorohydrin polymer/graphene oxide nanocomposite: preparation and characterization. **Chemical Papers**, v. 72, n. 5, p. 1299–1313, mai 2018.

HIGASHISAKA, K. *et al.* Nano-safety Research: Examining the Associations among the Biological Effects of Nanoparticles and Their Physicochemical Properties and Kinetics. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 243–248, 2017.

HIRAI, T. *et al.* Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 9, p. 808–816, 30 mai 2016.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, mai 2013.

HOONUR, R. S. *et al.* Transition metal complexes of 3-aryl-2-substituted 1,2-dihydroquinazolin-4(3H)-one derivatives: New class of analgesic and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2277–2282, jun. 2010.

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

JAIN, K. K. Introduction. In: JAIN, K. K. (Ed.). **The Handbook of Nanomedicine**. New York, NY: Springer New York, p. 1–9, 2017.

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

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 363–368, fev. 2016b.

JAN, T.-R. *et al.* Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2729, jun. 2012.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

JAYAKUMAR, T. *et al.* Ruthenium derivatives attenuate LPS-induced inflammatory responses and liver injury via suppressing NF- κ B signaling and free radical production. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, p. 1036–1039, mar. 2020.

JEREMIĆ, M. S. *et al.* Synthesis, structural analysis, solution equilibria and biological activity of rhodium (III) complexes with a quinquedentate polyaminopolycarboxylate. **RSC Advances**, v. 7, n. 9, p. 5282–5296, 2017.

JUNIOR, C. O. R. *et al.* Synthesis of genistein coupled with sugar derivatives and their inhibitory effect on nitric oxide production in macrophages. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 615–620, out. 2014.

KABIRI, M.; UNSWORTH, L. D. Application of Isothermal Titration Calorimetry for Characterizing Thermodynamic Parameters of Biomolecular Interactions: Peptide Self-Assembly and Protein Adsorption Case Studies. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3463–3473, out. 2014.

KANG, T.-S. *et al.* A rhodium (III)-based inhibitor of autotaxin with antiproliferative activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 256–263, fev. 2017.

KANG, T.-S. *et al.* Rhodium (III)-Based Inhibitor of the JMJD3-H3K27me3 Interaction and Modulator of the Inflammatory Response. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 14023–14026, nov. 2018.

KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 7, p. 15492–15500, 2018.

KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 3, p. 297–308, jun. 2002.

KAWAI, Y. Ornithine-containing lipids stimulate CD14-dependent TNF- α production from murine macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 197–203, jul. 2000.

KHAN, I. *et al.* Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 396–400, dez. 2015.

KIM, C.-S. *et al.* Immunotoxicity of zinc oxide nanoparticles with different size and electrostatic charge. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 195, dez. 2014.

KINBARA, M. *et al.* Cross-reactivity among some metals in a murine metal allergy model. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 5, p. 1022–1029, 20 set. 2011.

KOOPMANS, C.; RITTER, H. Formation of Physical Hydrogels via Host–Guest Interactions of β -Cyclodextrin Polymers and Copolymers Bearing Adamantyl Groups. **Macromolecules**, v. 41, n. 20, p. 7418–7422, out. 2008.

LAMPRECHT, A. **Nanotherapeutics: drug delivery concepts in nanoscience**. Singapore; Hackensack, NJ: Pan Stanford Pub.; Distributed by World Scientific Pub., 2009.

LANNA, E. G. *et al.* Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 85, n. 3–4, p. 247–259, ago. 2016.

LEBEDOVÁ, J. *et al.* Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 77–85, out. 2017.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, mar. 2015.

LEUNG, C.-H. *et al.* Bioactive iridium and rhodium complexes as therapeutic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 11–12, p. 1764–1776, jun. 2013.

LEWIN, K. The Research Center for Group Dynamics at Massachusetts Institute of Technology. **Sociometry**, v. 8, n. 2, p. 126, mai 1945.

LI, Jianshu; XIAO, Huining; LI, Jiehua; *et al.* Drug carrier systems based on water-soluble cationic β -cyclodextrin polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 329–342, 2004.

LI, Z. *et al.* γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 245–255, nov. 2007.

LINGAPPAN, K. NF- κ B in oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 81–86, fev. 2018.

LIU, L.-J. *et al.* A rhodium(III) complex inhibits LPS-induced nitric oxide production and angiogenic activity in cellulo. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 23–28, nov. 2014.

LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 17023, dez. 2017.

LIU, Y. *et al.* Study on the synthesis and drug-loading optimization of beta-cyclodextrin polymer microspheres containing ornidazole. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, p. 101836, ago. 2020.

LIVINGSTONE, S. E. The chemistry of ruthenium, rhodium, pallodium, osmium, iridium and platinum. **Pergamon Texts in Inorganic Chemistry**, v.25, 1973.

LJUBIJANKIĆ, N. *et al.* Antimicrobial And Genotoxic Activity Of Novel Ruthenium(III) Complex With N-Phenyl-5-Nitrosalicylideneimine. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 1511–1518, 2018.

LULA, I. *et al.* Study of the BPP7a peptide and its β -cyclodextrin complex: physicochemical characterization and complete sequence specific NMR assignments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1765–1773, set. 2011.

MA, D.-L. *et al.* Rhodium complexes as therapeutic agents. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 7, p. 2762–2771, 2016.

MAN, B. Y.-W. *et al.* Group 9 metal-based inhibitors of β -amyloid (1–40) fibrillation as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. **Chemical Science**, v. 2, n. 5, p. 917, 2011.

MEDICI, S. *et al.* Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, fev. 2015.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, mar. 2010.

MOCANU, G.; VIZITIU, D.; CARPOV, A. Cyclodextrin Polymers. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 16, n. 4, p. 315–342, jul. 2001.

MOHAMED, M. A. *et al.* Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: **Membrane Characterization**. [s.l.] Elsevier, p. 3–29, 2017.

MOON, S.-M. *et al.* Oleamide suppresses inflammatory responses in LPS-induced RAW264.7 murine macrophages and alleviates paw edema in a carrageenan-induced inflammatory rat model. **International Immunopharmacology**, v. 56, p. 179–185, mar. 2018.

MORAGUES, M. E. *et al.* CO-Releasing Binuclear Rhodium Complexes as Inhibitors of Nitric Oxide Generation in Stimulated Macrophages. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 13806–13808, dez. 2013.

MORIN-CRINI, N. *et al.* Water-insoluble β -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms. **Progress in Polymer Science**, v. 78, p. 1–23, mar. 2018.

MORRIS, C. J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. (Eds.). **Inflammation Protocols**. New Jersey: Humana Press, v. 225, p. 115–122, 2003.

MRÓWCZYŃSKI, R. *et al.* Cyclodextrin-Based Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. **Nanomaterials**, v. 8, n. 3, p. 170, mar. 2018.

MUÑOZ, L. E. *et al.* Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 40, 19 set. 2016.

NAMGUNG, R. *et al.* Poly-cyclodextrin and poly-paclitaxel nano-assembly for anticancer therapy. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3702, set. 2014.

NASROLLAHZADEH, M. *et al.* Types of Nanostructures. In: **Interface Science and Technology**. [s.l.] Elsevier, v. 28, p. 29–80, 2019.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES *et al.* A quadrennial review of the National Nanotechnology Initiative: nanoscience, applications, and commercialization. **National Academies Press**, abr. 2020.

NETEA, M. G. *et al.* A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, ago. 2017.

O'NEILL, K. *et al.* Flow Cytometry Bioinformatics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 12, p. e1003365, dez. 2013.

OLIVERI, V.; VECCHIO, G. Cyclodextrin-based nanoparticles * *Dedicated to the memory of Dr. Carmela Spatafora. In: **Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery**. [s.l.] Elsevier, p. 619–658, 2018.

ORGANIZAÇÃO DE COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (OECD). **Test guideline 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test**. 29 de julho de 2016. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>. Acesso em: 26 de maio de 2021.

ORPRECIO, R.; EVANS, C. H. Polymer-immobilized cyclodextrin trapping of model organic pollutants in flowing water streams. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 8, p. 2103–2110, nov. 2003.

OZAWA, T. Thermal analysis — review and prospect. **Thermochimica Acta**, v. 355, n. 1–2, p. 35–42, jul. 2000.

PALLARDY, M.; BECHARA, R. Chemical or Drug Hypersensitivity: Is the Immune System Clearing the Danger? **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 1, p. 14–22, 4 maio 2017.

PANDAY, A. *et al.* Transcription Factor NF- κ B: An Update on Intervention Strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 6, p. 463–483, dez. 2016.

PAPAKONSTANTINO, V. D. *et al.* A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties? **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2017, p. 1–19, 2017.

PARK, E.-K. *et al.* Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 8, p. 746–750, abr. 2007.

PASSOS, J. J. *et al.* Double continuous injection preparation method of cyclodextrin inclusion compounds by spray drying. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 345–351, jul. 2013.

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.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, dez. 2018.

PRATT, D. Y. *et al.* Preparation and sorption studies of β -cyclodextrin/epichlorohydrin copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p. 2982–2989, 2010.

PROCHOWICZ, D. *et al.* Metal complexes based on native cyclodextrins: Synthesis and structural diversity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 306, p. 331–345, jan. 2016.

PROCHOWICZ, D.; KORNOWICZ, A.; LEWIŃSKI, 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, nov. 2017.

PSOMAS, G. Copper (II) and zinc (II) coordination compounds of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Structural features and antioxidant activity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 412, p. 213259, jun. 2020.

QIU, C. *et al.* High-efficiency production of γ -cyclodextrin using β -cyclodextrin as the donor raw material by cyclodextrin opening reactions using recombinant cyclodextrin glycosyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 75–80, fev. 2018.

QIU, N.; LI, X.; LIU, J. Application of cyclodextrins in cancer treatment. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 3–4, p. 229–246, dez. 2017.

RAMOS, M. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 27, n. 13, p. 1179–1213, fev 2018.

RANI, A. *et al.* Nanostructure-mediated Delivery of Therapeutic Drugs - A Comprehensive Review. **Int. j. chem. biochem. sci.**, v. 15, p. 5–14, set 2019.

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

ROACH, K. A.; STEFANIAK, A. B.; ROBERTS, J. R. Metal nanomaterials: Immune effects and implications of physicochemical properties on sensitization, elicitation, and exacerbation of allergic disease. **Journal of Immunotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 87–124, jan. 2019.

RUIZ, J. *et al.* Novel C,N-chelate rhodium(iii) and iridium(iii) antitumor complexes incorporating a lipophilic steroidal conjugate and their interaction with DNA. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 41, p. 12847, 2012.

SHAHABI NEJAD, M. *et al.* Fabrication of Poly (β -Cyclodextrin-Epichlorohydrin-Thiourea) to Efficient Removal of Heavy Metal Ions from Wastewater. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 6, p. 1626–1636, jun. 2020.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, dez. 2007.

SHELLEY, H.; BABU, R. J. Role of Cyclodextrins in Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 7, p. 1741–1753, jul. 2018.

SHUKLA, S.; MISHRA, A. P. Metal complexes used as anti-inflammatory agents: Synthesis, characterization and anti-inflammatory action of VO (II)-complexes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1715–1721, nov. 2019.

SIGMA Aldrich. 2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/c4767>. Acesso em: 28 jun. 2022.

SINGHVI, G.; SINGH, M. Review: In vitro Drug Release Characterization Models. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 2, n. 1, p. 77–84, mar. 2011.

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

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1534, 24 fev. 2020.

SOUFLI, I. *et al.* Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 353, 2016.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, dez. 2016.

STRINGER, T. *et al.* Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of ferrocenyl azines and their rhodium(I) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 788, p. 1–8, jul. 2015.

SURI, S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 16, 2007.

SWARBRICK, J. (ED.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3rd ed ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, jan. 2018.

TEIXEIRA, T. M. *et al.* Ruthenium complexes show promise when submitted to toxicological safety tests using alternative methodologies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113262, abr. 2021.

TELI, M.; MUTALIK, S.; RAJANIKANT, G. K. Nanotechnology and nanomedicine: going small means aiming big. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 16, p. 1882–1892, jun. 2010.

TIAN, B.; HUA, S.; LIU, J. Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, p. 115805, mar. 2020.

TIETJEN, G. T. *et al.* Focus on Fundamentals: Achieving Effective Nanoparticle Targeting. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 7, p. 598–606, jul. 2018.

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.

UMBUZEIRO, G. D. A.; HERINGA, M.; ZEIGER, E. In Vitro Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring. **In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment**, v. 157, p. 59–80, 2016.

UMBUZEIRO, G. D. A.; HERINGA, M.; ZEIGER, E. In Vitro Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring. **In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment**, v. 157, p. 59–80, 2016.

VENTOLA, C. L. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. **P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 37, n. 9, p. 512–525, set. 2012.

WANG, L. *et al.* Anti-Inflammatory Activities of Kukoamine A From the Root Bark of *Lycium chinense* Miller. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 3, p. 1934578X2091208, mar. 2020.

WU, L.-P.; WANG, D.; LI, Z. Grand challenges in nanomedicine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, p. 110302, jan. 2020.

XU, R. Light scattering: A review of particle characterization applications. **Particuology**, v. 18, p. 11–21, fev. 2015.

XUE, Q. *et al.* Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3805, 29 nov. 2018.

ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 641–651, jul. 2013.

ZHANG, J. *et al.* Inhibitory Receptors of the Immune System: Functions and Therapeutic Implications. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 6, n. 6, p. 407–414, dez. 2009.

ZHONG, H. *et al.* Formulation and evaluation of β -cyclodextrin polymer microspheres for improved HTHP filtration control in water-based drilling fluids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 1135-1149, set. 2020.

ZHONG, H.-J. *et al.* 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, jan. 2017.

ZHONG, H.-J. *et al.* Antagonism of mTOR Activity by a Kinetically Inert Rhodium (III) Complex. **ChemPlusChem**, v. 79, n. 4, p. 508–511, abr. 2014.