



**CLARA ISABEL RIBEIRO MATERIAIS LIBERTADORES DE MONÓXIDO DE  
MAGALHÃES CARBONO COM POTENCIAL TERAPÊUTICO**





**CLARA ISABEL RIBEIRO MAGALHÃES** **MATERIAIS LIBERTADORES DE MONÓXIDO DE CARBONO COM POTENCIAL TERAPÊUTICO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Maria de Sousa Gonçalves, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e ao Doutor Martyn Pillinger, Investigador Auxiliar do CICECO da Universidade de Aveiro.



Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida dedico, não todo o meu esforço e empenho, mas sim a verdadeira razão do meu sucesso.

A ti mãe que me acompanhaste durante toda esta caminhada, que te empenhaste em dar-me o melhor de ti, que tantos sacrifícios passaste, que tantas lágrimas deitaste, que tantas horas de sono perdeste. A ti, querida mãe, que tens sido amiga, companheira, conselheira, confidente, porto de abrigo nos meus momentos de devaneios, colo de carinho onde tantas e tantas vezes me ajoelhei para chorar, que tantas lágrimas me secaste com os teus dedos forrados a pele gretada de tanto trabalhar para que eu, a filha que tanto te ama, pudesse estar aqui hoje. A ti mãezinha, fonte de abrigo, de carinho de amor, e, para mim, musa de inspiração e exemplo... A ti minha querida mãe dedico este trabalho com o mais profundo e sentido agradecimento por este caminho que partilhaste sempre sem hesitar ao meu lado.

A ti Paizinho...Sim...Paizinho. Assim foi, assim é e assim serás sempre. O meu Paizinho. Partiste cedo mas a marca ficou como que um manual de instruções cravado na minha memória e no meu coração para que a minha vida tivesse um rumo, um caminho, um sentido existencial recheada de valores alicerçados no amor, na honra, na honestidade, na compaixão pelo próximo bem como na união fundamental da família. A ti, meu homem amigo, meu conselheiro, meu mestre, meu educador, minha fonte de força para lutar nos momentos mais adversos. A ti, Paizinho que mesmo não estando fisicamente presente és a minha fonte de inspiração, o meu manual da existencialidade. A ti meu Pai, que naquela promessa encontrei a força que precisava para seguir em frente e estar aqui hoje. A ti, Paizinho que muitas vezes me aninho na cama e me questiono sobre a razão do meu ser, e logo, aparece o teu rosto sorridente, e aí, sinto o teu abraço que me conforta, me aconchega e me diz: "-Vamos menina, o caminho é para a frente." A ti, Paizinho que és a luz que me ilumina em todos os momentos que és o farol que direciona todas as decisões de maior importância na minha vida. A ti, Paizinho, eu dedico este trabalho carregado do meu amor por ti esperando e desejando que estejas orgulhoso desta tua filha que tanto orgulho tem em ti e tanto amor te tem.

A vocês os dois, Pai e Mãe eu dedico não só este trabalho mas toda a minha existência.

Muito obrigado por tudo. Amo-vos com o amor incondicional no mais profundo reconhecimento por tudo o que por mim fizeram.



## **o júri**

presidente

**Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Isabel Maria de Sousa Gonçalves**  
professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor André Duarte Lopes**  
professor auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve





## agradecimentos

Uma vez aqui, cumpre-me gentilmente, agradecer a todos aqueles que permitiram chegar ao fim deste longo percurso. À professora Isabel Gonçalves e ao Doutor Martyn Pillinger, orientadores da presente dissertação de mestrado, a quem agradeço o excelente acompanhamento, a confiança em mim depositada, a exigência requerida e todos os valiosos contributos para este trabalho.

Ao professor Carlos Romão, ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) e a todos aqueles com quem tive o prazer de me cruzar neste instituto, pela boa disposição, por me acolherem tão bem e pelo estímulo do meu interesse pelo tema e principalmente pela investigação científica, interesse esse que irá com certeza refletir-se na vida prática e me fará progredir na vida profissional e pessoal.

À Doutora Ana Gomes, um especial obrigada pela ajuda incansável, pela paciência, por todo o apoio e palavras de incentivo. Se esta tese existe, em muito se deve a esta excelente pessoa e profissional.

A todos os meus amigos, que fizeram de Aveiro e de todos os anos aqui passados inesquecíveis, simplesmente os melhores anos da minha vida. Não querendo individualizar, mas àqueles que me acompanharam desde sempre: Bel, Sílvia, Edu, Nádía e Diana, um muito obrigado, por fazerem de Aveiro a nossa casa e por tornarem esta caminhada única. Obrigado ainda por compreenderem e desculparem a minha ausência em períodos mais complicados. Esta tese é um pouquinho de cada um de vocês.

Por fim o mais importante, um obrigado às pessoas mais importantes da minha vida: à minha mãe, à minha irmã e cunhado, e ao meu namorado. À minha mãe por todas as razões já mencionadas, não tenho como agradecer tudo o que já fez por mim. À minha irmã e cunhado, por me ajudarem nas horas de aperto, pela prontidão com que oferecem ajuda seja a que dia ou hora for, pelas palavras de apoio, pela força e por fazerem de mim o que sou hoje. E finalmente, mas não o menos importante, ao meu namorado, por me ter acompanhado nesta fase mais complicada, por toda a paciência e compreensão inesgotável mesmo quando o mau feitiço atacava, por exigir de mim aquilo que, por vezes, nem eu penso ser capaz, por me motivar e mostrar que apesar de tudo parecer estar a correr mal, há alguém à espera do melhor de nós e que merece o nosso empenho e dedicação.

Sem todos estes contributos, a minha investigação não teria sido possível, por isso mesmo, MUITO OBRIGADO A TODOS!



**palavras-chave**

Monóxido de Carbono, Moléculas libertadoras de Monóxido de Carbono, Molibdénio, Complexos Metalocarbonílicos, Materiais libertadores de Monóxido de Carbono, Hidróxidos Duplos Lamelares.

**resumo**

Até à segunda metade do século XX, o monóxido de carbono (CO) era conhecido apenas como um gás tóxico. Nas últimas décadas a identificação da sua produção no organismo humano e participação em alguns processos fisiológicos e patológicos tem aberto perspectivas para a utilização de CO como fármaco numa vasta gama de doenças. Contudo, é difícil contornar as limitações associadas à administração por inalação deste gás tóxico, o que desencadeou a procura de moléculas capazes de distribuir CO aos tecidos de um organismo vivo de um modo controlado e terapêutico. Uma estratégia para ultrapassar este problema passa pelo desenvolvimento de moléculas libertadoras de monóxido de carbono (CORMs). Analisando detalhadamente a literatura existente constatamos que os complexos metalocarbonílicos são a classe de CORMs mais promissora, no entanto possuem inconvenientes no que diz respeito à sua utilização terapêutica, pelo que nesta tese foram estudados métodos de encapsulação de forma a minimizar alguns efeitos adversos. O presente trabalho aborda a síntese e caracterização do complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795) e respetiva intercalação em hidróxidos duplos lamelares do tipo LDH-Zn,Al. Para a análise da taxa de libertação de CO do ALF795 e da sua forma intercalada foram realizados ensaios qualitativos de libertação de CO e para a quantificação do CO libertado foram realizados estudos em sangue de ovelha (solução de Alsevers) à temperatura ambiente e a 37 °C.



**keywords**

Carbon Monoxide, Carbon Monoxide releasing molecules, Molybdenum, Metal Carbonyl complexes, Carbon Monoxide Releasing Materials, Layered Double Hydroxide.

**abstract**

Until the second half of the twentieth century, carbon monoxide (CO) was known only as a toxic gas. In recent decades the identification of its production in the human body and its participation in some physiological and pathological processes have opened prospects for the use of CO as a drug in a wide range of disorders. However, it is hard to circumvent the limitations associated with the administration of this toxic gas by inhalation, which triggered the search for molecules able to distribute CO to the tissues of a living organism in a controlled and therapeutic way. One strategy to overcome this problem encompasses through the development of CO releasing molecules (CORMs). Analysing in detail the existing literature we found that metal-carbonyl complexes are the most promising class of CORMs; however, they have some drawbacks with respect to their therapeutic use. In this thesis, encapsulation methods were studied with the aim of minimizing some of these adverse effects. The complex  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795) was synthesized and characterized, and intercalated in a Zn-Al layered double hydroxide. For the qualitative analysis of the rate of CO liberation from the complex ALF795 and the hybrid material, some assays were performed involving oximetry measurements after incubation of samples with whole sheep blood in Alserver's solution at either room temperature or 37 °C.



## Abreviaturas:

μs	Microsegundos
AE	Análise elementar
ATP	Adenosina trifosfato
cGMP	Guanosina 3,5-monofosfato cíclica
CO	Monóxido de carbono
COHb	Carboxi-hemoglobina
COMb	Carboxi-mioglobina
CORMs	Moléculas libertadoras de monóxido de carbono
CORMAs	Materiais libertadores de monóxido de carbono
CP MAS	Polarização cruzada e rotação no ângulo mágico
deoxy-Mb	Desoximioglobina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Cínase regulada por sinal extracelular
f	forte
FID	Detetor de ionização da chama
g	Gramas
GC-RCP	Cromatografia gasosa com fotómetro redutor de composto
HO	Heme-oxigenase
IV	Infravermelho
JNK	Cínase N-terminal c-jun
kHz	Quilohertz
KPi	Tampão fosfato
LDHs	Hidróxidos duplos lamelares
m	Médio
MAPK	Cínase de proteínas activada por mitogéneo
Mb	Mioglobina
MCCs	Complexos metalocarbonílicos
Met-Hb	Metahemaglobina
MHz	Megahertz

mL	Mililitro
Moco	Cofator molibdénio
ms	milisegundos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O <sub>2</sub> -Hb	Oxi-hemoglobina
ppb	Partes por bilião
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio
s	Segundos
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
sGC	Guanilil ciclase solúvel
sh	ombro
TEM	Microscopia de transmissão eletrónica
UV/Vis	Ultravioleta/visível
vs	Muito forte
w	Fraco



## LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação da ligação à hemoglobina de a) O <sub>2</sub> (oxi-hemoglobina) e b) CO (carboxi-hemoglobina). .....	2
Figura 2: Representação esquemática da via de degradação da hemoglobina e consequente formação de CO, através da enzima heme-oxigenase (figura cedida pelo Prof. Carlos Romão). .....	3
Figura 3: Estrutura raios -X das enzimas HO-1 e HO-2 humanas (adaptado da referência 16).....	4
Figura 4: Possíveis vias de sinalização do CO. ....	5
Figura 5: Aparelho desenvolvido especificamente para terapia com monóxido de carbono por inalação, aparelho de distribuição Covox DS desenvolvido por Ikaria. ....	6
Figura 6: Via alternativa para a libertação terapêutica de CO para os tecidos lesados (adaptado da referência 36). ....	7
Figura 7: Classes de compostos para os quais foram reportadas condições experimentais que levam à libertação de CO (adaptado da referência 36). ....	8
Figura 8: Representação esquemática das orbitais moleculares envolvidas no efeito sinérgico de transferência eletrônica entre um metal de transição M e o ligando CO. ....	9
Figura 9: Cofator molibdénio (Moco). ....	12
Figura 10: Representação de LDH-Zn,Al (adaptado da referência 72).....	19
Figura 11: Principais aplicações industriais dos LDHs (adaptado da referência 79) .....	21
Figura 12: Espectro UV/Vis das bandas Q do grupo heme da desoximioglobina (Deoxy-Mb) e da carboximioglobina (COMb) (Retirada da referência 101).....	25
Figura 13: A) Espectro absoluto de 10 µM de Hb-O <sub>2</sub> (linha contínua) e 10 µMde COHb (linha pontuada). B) Espectro de diferença de COHb e Hb-O <sub>2</sub> , linha pontuada indica onde a diferença entre COHb e Hb-O <sub>2</sub> é igual a zero (Retirada da referência 104).....	27

Figura 14: Cromatógrafo gasoso equipado com um fotômetro redutor de composto (GC-RCP). .....	28
Figura 15: Estrutura do complexo ALF795.....	31
Figura 16: Espectro de IV (KBr) de ALF795. As bandas selecionadas encontram-se realçadas. ....	32
Figura 17: Espectro de <sup>13</sup> C CP MAS NMR do complexo ALF795. ....	32
Figura 18: Representação do material LDH-Zn,Al .....	33
Figura 19: Espectro de IV (KBr) do material LDH-Zn,Al. As bandas selecionadas encontram-se realçadas.....	34
Figura 20: Padrões de Raio-X de pós do material LDH-Zn,Al. ....	34
Figura 21: Padrões de Raio-X de pós de (a) LDH-Zn,Al e (b) LDH-ALF795. ....	35
Figura 22: Espectro de IV (KBr) de (a) LDH-Zn,Al (b) ALF795 e (c) LDH-ALF795. As bandas selecionadas encontram-se realçadas. ....	36
Figura 23: Espectro de <sup>13</sup> C CP MAS NMR de a) ALF795 e b) material LDH-ALF795.....	37
Figura 24: Imagens de SEM de LDH-ALF795. Mapas elementares para os elementos Mo, Zn e Al correspondentes à imagem de SEM legendada com “SEM”. ....	38
Figura 25: Espectros de UV/Vis da hemoglobina com a adição de ALF795, em tampão KPi a 37 °C, coletados ao longo do tempo. (O <sub>2</sub> -Hb-Oxihemoglobina) .....	39
Figura 26: Espectros de UV/Vis da hemoglobina com a adição do material Zn,Al-ALF795 LDH, em tampão KPi a 37 °C, coletados ao longo do tempo. (O <sub>2</sub> -Hb-Oxihemoglobina) ..	40
Figura 27: Espectros de UV/Vis coletados 20 minutos após a adição do complexo ALF795 e do material LDH-ALF795 à solução de hemoglobina. ....	41
Figura 28: Farmacocinética do complexo ALF795 quando administrado <i>in vivo</i> , cedidos pelo Prof. Carlos Romão. ....	42

Figura 29: Número de equivalentes de CO libertados ao longo do tempo quando colocado (-) ALF795 ou (-) LDH-ALF795 em sangue de ovelha diluído em solução de Alsevers, à temperatura ambiente. ....	45
Figura 30: Número de equivalentes de CO libertados ao longo do tempo quando colocado (-) ALF795 ou (-) LDH-ALF795 em sangue de ovelha diluído em solução de Alsevers, a T=37 °C. ....	48
Figura 32: Tubo de Schlenk .....	52
Figura 31: Linha de vácuo. ....	52
Figura 33: Câmara de luvas. ....	52
Figura 34: Montagem experimental para a síntese de LDH-Zn,Al. ....	55
Figura 35: Ilustração do oxímetro utilizado (AVOXimeter 4000 da A-vox Instruments Inc.).....	58



## LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas do monóxido de carbono.....	1
Tabela 2: % COHb no sangue, concentração ambiente de CO e sintomas associados na saúde humana (adaptado das referências 8 e 9).....	2
Tabela 3: Propriedades farmacocinéticas e farmacológicas de CORMs.....	11
Tabela 4: CORMs com molibdénio no centro metálico, estudados até à data .....	14
Tabela 5: Suportes sólidos utilizados até à data para encapsulação de CORMs.....	17
Tabela 6: Resumo dos fármacos intercalados em LDHs, alguns exemplos e vantagens. ...	23
Tabela 7: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com ALF795 em sangue de ovelha (2.298 mM) à temperatura ambiente. ....	43
Tabela 8: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com LDH-ALF795 em sangue de ovelha (2.996 mM) à temperatura ambiente.....	44
Tabela 9: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com ALF795 em sangue de ovelha (2.298 mM) a T= 37 °C. ....	46
Tabela 10: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com LDH-ALF795 em sangue de ovelha (3.341 mM) a T= 37 °C.....	47



## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. O monóxido de carbono (CO).....	1
1.2. Moléculas libertadoras de CO (CORMs).....	7
1.3. CORMs de molibdénio.....	12
1.4. Materiais libertadores de monóxido de carbono (CORMAs).....	16
1.5. Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs) .....	18
1.6. Aplicações dos Hidróxidos Duplos Lamelares .....	21
1.7. Detecção da libertação de CO.....	24
1.8. Linhas Orientadoras do Trabalho .....	29
2. Resultados e discussão.....	31
2.1. Síntese e caracterização de $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$ (ALF795) .....	31
2.2. Síntese e caracterização do material LDH-Zn,Al .....	33
2.3. Síntese e caracterização do material do material LDH-ALF795 .....	35
2.4. Análise qualitativa dos perfis de libertação de CO de ALF795 e LDH-ALF795 .....	39
2.5. Quantificação de CO libertado .....	42
3. Conclusão .....	49
3.1. Observações finais.....	49
3.2. Trabalho futuro .....	50
4. Experimental .....	51
4.1. Materiais e reagentes.....	51
4.2. Métodos de caracterização .....	53
4.3. Síntese do complexo $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$ (ALF795) .....	53
4.4. Síntese de LDH-Zn,Al .....	54
4.5. Síntese do material LDH-ALF795 .....	56
4.6. Análise de libertação de CO por UV/Vis.....	56
4.7. Quantificação de CO libertado por medição da elevação de COHb .....	57
5. Bibliografia .....	59





## 1. Introdução

### 1.1. O monóxido de carbono (CO)

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro e insípido e é um produto da combustão incompleta de compostos orgânicos. O CO é um gás diatômico de baixo peso molecular, composto por um átomo de carbono e outro de oxigénio ligados por uma tripla ligação, como demonstrado na **Tabela 1**.

**Tabela 1: Propriedades físicas e químicas do monóxido de carbono.**

<b>:C≡O:</b>	
<b>Estrutura da molécula de monóxido de carbono</b>	
<b>Geometria</b>	Linear
<b>Momento dipolar</b>	0.112 D
<b>Densidade</b>	1.165Kg/m <sup>3</sup> (20 °C, 1atm)
<b>Massa molar</b>	28.01 g/mol (ligeiramente mais leve do que o ar)
<b>Tamanho molecular</b>	113 pm
<b>Ponto de ebulição</b>	-192 °C
<b>Ponto de fusão</b>	-205 °C
<b>Solubilidade</b>	0.0026 g/100mL (20 °C) (moderadamente solúvel em água)

Este composto é, há muito tempo, conhecido como sendo um poluente e até mesmo tóxico, sendo usualmente chamado de “*silent killer*” desde o início do século XX em que foi reportado cientificamente como uma molécula perigosa (1).

A má reputação do monóxido de carbono é devida à sua toxicidade, causando danos crónicos e inúmeros óbitos, por ser indetetável mesmo em elevadas concentrações (2-4). A ligação do monóxido de carbono à hemoglobina, formando carboxi-hemoglobina (COHb) e diminuindo a capacidade de transporte de oxigénio pelos glóbulos vermelhos, parece ser o principal mecanismo de ação subjacente aos efeitos tóxicos da exposição a baixos níveis de CO (4, 5). O monóxido de carbono possui uma afinidade *ca.* 200 vezes maior para a hemoglobina do que o O<sub>2</sub>, dando origem à carboxi-hemoglobina (COHb), **Figura 1**.

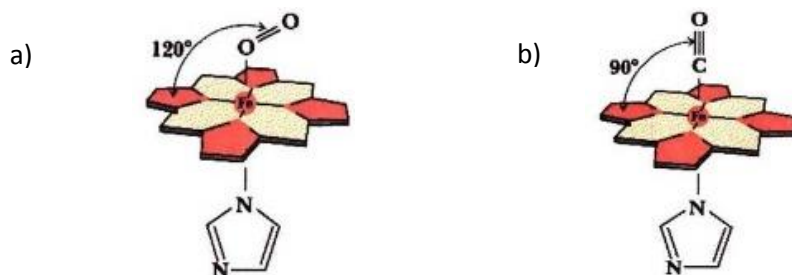


Figura 1: Representação da ligação à hemoglobina de a) O<sub>2</sub> (oxi-hemoglobina) e b) CO (carboxi-hemoglobina).

No entanto, a toxicidade desta molécula pode ainda estar associada a outros mecanismos: 1) alteração das propriedades de dissociação da oxi-hemoglobina e por consequência a capacidade de libertação de O<sub>2</sub> nos tecidos; 2) ligação do CO ao citocromo c oxidase (nomeadamente ao complexo IV da cadeia transportadora de eletrões) diminuindo a respiração celular; 3) ligação à mioglobina provocando uma disfunção do miocárdio e do músculo-esquelético (2, 6, 7). Os efeitos tóxicos do CO estão extensamente dependentes da concentração de CO e consequentemente com a concentração de COHb no sangue, como demonstrado na **Tabela 2**.

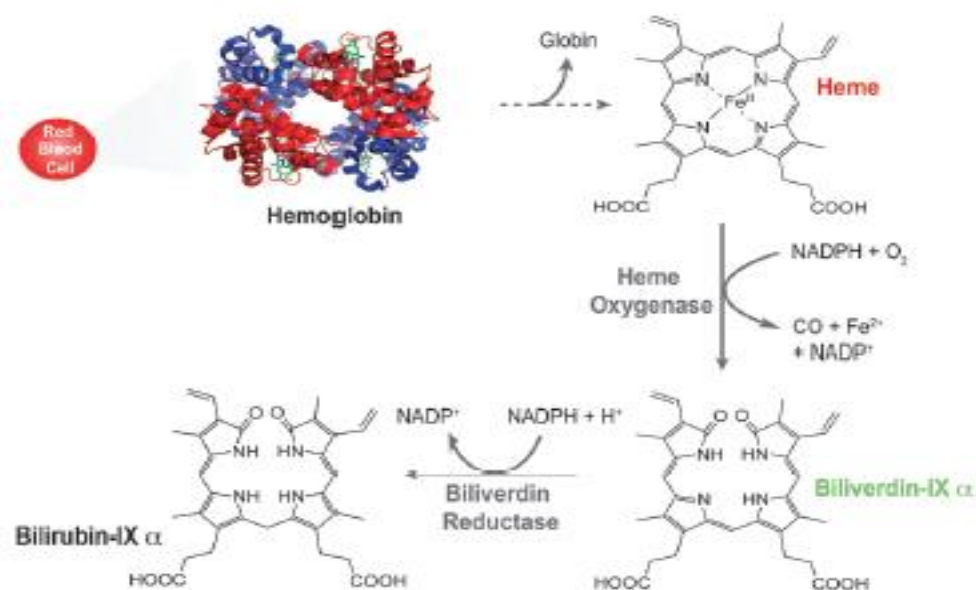
**Tabela 2: % COHb no sangue, concentração ambiente de CO e sintomas associados na saúde humana (adaptado das referências 8 e 9).**

% COHb no sangue	Concentração (ppm)	Sintomas
2	10	Assintomático
10	70	Cansaço em pessoas saudáveis e dores de cabeça
20	120	Tonturas, náuseas e dispneia
30	220	Perturbação visual
40-60	350-520	Confusão, síncope, convulsões e coma
60-80	1950	Disfunção cardiopulmonar e coma
	10 000	Letal em minutos

Descobertas posteriores levaram, no entanto, a comunidade científica a reconsiderar o papel do CO. Em 1949, Sjöstrand reportou pela primeira vez que a baixa quantidade de COHb quantificada, que inicialmente pensou ser devido ao CO absorvido do ar

atmosférico, era resultado da produção contínua de CO pelo organismo humano e que estes valores aumentavam consideravelmente sob condições patológicas (10, 11).

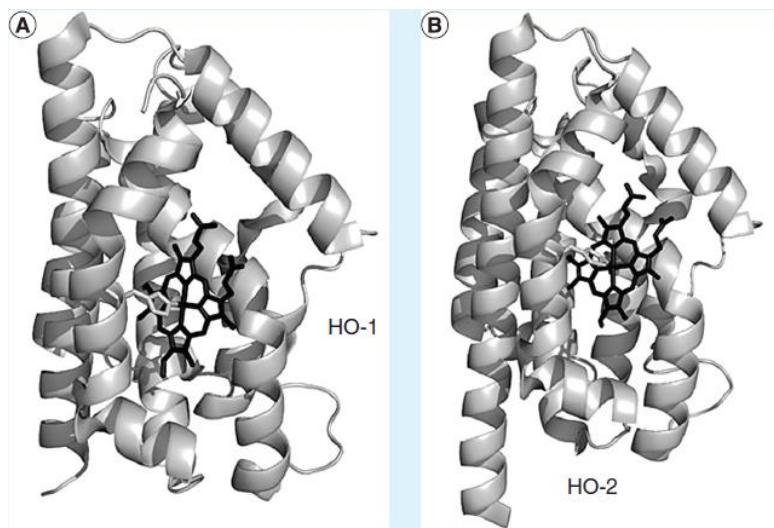
Mais tarde, em 1952, Sjöstrand provou que a decomposição de hemoglobina *in vivo* produzia CO, e em 1963, Coburn descobriu que elevados níveis de hemoglobina registados após a destruição dos eritrócitos aumentavam a produção endógena de CO, refletida pelos elevados níveis de COHb (12-14). Mais tarde, Tenhunen e a sua equipa identificaram a enzima heme-oxigenase (HO) como sendo a enzima responsável pela catálise do grupo heme e conseqüente formação de CO (15). A HO catalisa a clivagem oxidativa do grupo heme para gerar biliverdina-IX  $\alpha$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e CO, através de uma ação combinada entre a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) – citocromo c (P450) redutase e o oxigénio molecular. A biliverdina-IX  $\alpha$  formada no passo anterior é rapidamente convertida em bilirrubina-IX  $\alpha$  pela biliverdina redutase, e tendo, mais uma vez, como cofator o NADPH, como se encontra representado na **Figura 2**.



**Figura 2:** Representação esquemática da via de degradação da hemoglobina e conseqüente formação de CO, através da enzima heme-oxigenase (figura cedida pelo Prof. Carlos Romão).

Este processo pode ser observado por qualquer indivíduo e deve ser a reação enzimática mais visível, uma vez que ocorre durante o desenvolvimento de equimoses. No local da lesão a desoxi-hemoglobina libertada dos glóbulos vermelhos lisados confere a cor vermelha/roxa, que de forma gradual vai adquirindo a cor verde devido à oxidação do grupo heme e conseqüente formação da biliverdina. A redução deste produto intermédio em bilirrubina irá conferir a coloração amarela típica desta molécula (15).

Até à atualidade foram identificadas três isoformas da enzima hemoxygenase: a HO-1 induzível e a HO-2 expressa de forma constitutiva, apresentadas na **Figura 3** e a HO-3, descoberta recentemente e por consequência a menos caracterizada (16).



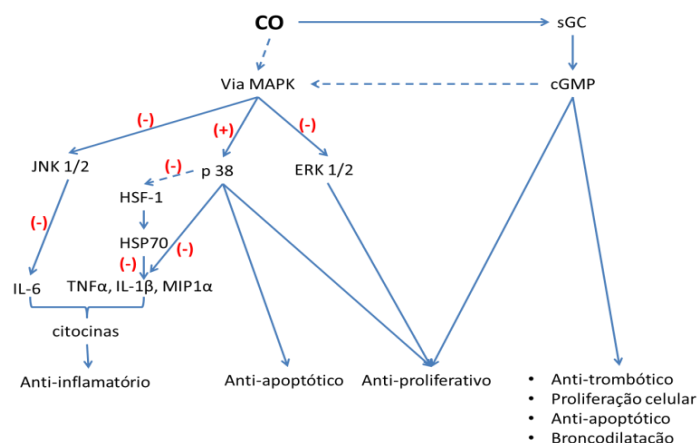
**Figura 3:** Estrutura raios -X das enzimas HO-1 e HO-2 humanas (adaptado da referência 16)

Em condições fisiológicas, a HO-2 é a isoforma encontrada em maior quantidade nos tecidos dos mamíferos em especial no cérebro, fígado e endotélio, pelo contrário, a expressão da HO-1 é relativamente baixa exceto no baço, local onde ocorre o *turnover* da hemoglobina dos eritrócitos (17). A HO é responsável por cerca de 86% da produção de CO nos humanos, os restantes 14% provêm de diversas fontes, incluindo fontes “não hêmicas”, tais como: oxidação de lípidos (produtos secundário), foto oxidação, metabolismo de xenobióticos e bactérias presentes no organismo humano (18). Após a formação endógena de CO, este pode seguir 4 vias:

- eliminação pela expiração, onde o CO difunde através da membrana alvéolo-capilar influenciado pelo volume alveolar, ventilação e concentração de hemoglobina nos capilares pulmonares (2);
- redistribuição celular, onde o CO que não se encontra ligado à hemoglobina difunde para o interior das células e liga-se a proteínas hêmicas que aí se encontram (19);
- oxidação do CO, em que a conversão é catalisada pelo citocromo c oxidase na mitocôndria e com a consequente formação de CO<sub>2</sub> (20);
- influenciar vias de sinalização intracelulares.

Confirmado o facto de que o CO poderia ser produzido endogenamente, a comunidade científica reconsiderou o papel do CO no organismo, concluindo que quando este se encontra em baixas concentrações pode influenciar vias de transdução de sinal intracelulares. Atualmente sabe-se que este composto pode exercer propriedades vaso reguladoras (21), assim como pode modular fenómenos de inflamação, apoptose e proliferação celular *in vitro* e *in vivo* (22, 23). Estas descobertas levaram a investigações mais intensivas acerca dos mecanismos moleculares subjacentes.

Estudos demonstraram que a exposição celular ao CO modulava de forma direta ou indireta várias moléculas de sinalização intracelular. Investigações iniciais revelaram o efeito vasodilatador desta molécula, neste caso o CO liga-se à porção hémica da guanilil ciclase solúvel (sGC) ativando-a e causando a ativação da guanosina 3,5-monofosfato cíclica (cGMP) e resultando no relaxamento vascular (24, 25). Entretanto foram reportados outros efeitos do cGMP mediado pelo CO incluindo neuro-transmissão (26), inibição da agregação plaquetária (27), proliferação do músculo liso vascular (28), proteção da apoptose das células  $\beta$  pancreáticas (29) e broncodilatação, como esquematizado na **Figura 4** (30).



**Figura 4: Possíveis vias de sinalização do CO.**

No entanto, existem ainda outras vias para a modulação da sinalização celular do CO, incluindo a via regulada por cinases de proteínas ativada por mitogéneo (MAPK), que é uma família de proteína cinases Ser/Thr que são ativadas por uma grande variedade de estímulos. Existem três principais subfamílias da via de sinalização de MAPK, entre as quais a cínase regulada por sinal extracelular (ERK), p38 MAPK e cinases N-terminal c-

jun (JNK). Vários aspectos dos efeitos protetores do CO aparentam ser mediados pela via p38 MAPK, um sistema que está envolvido na resposta fisiológica a sinais de *stress* (31). Atualmente encontra-se descrito que os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependentes de potássio ( $\text{K}^+$ ) são potenciais alvos do CO (32), em que o CO se pode ligar diretamente aos canais de  $\text{K}^+$  ativando-os e quando estes canais se encontram ativos ocorre a hiperpolarização da membrana que pode ter vários efeitos como por exemplo o relaxamento do músculo liso (33). Será interessante observar que sGC se encontra envolvida na cascata de sinalização que é ativada por baixos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e inibida por elevados níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (34).

Em virtude da descoberta do efeito do CO em diversos processos biológicos a comunidade científica considerou o papel deste como agente terapêutico. A primeira abordagem ponderada para aplicação terapêutica foi por inalação deste gás com doses controladas, através de um aparelho desenvolvido, apresentado na **Figura 5** (35).

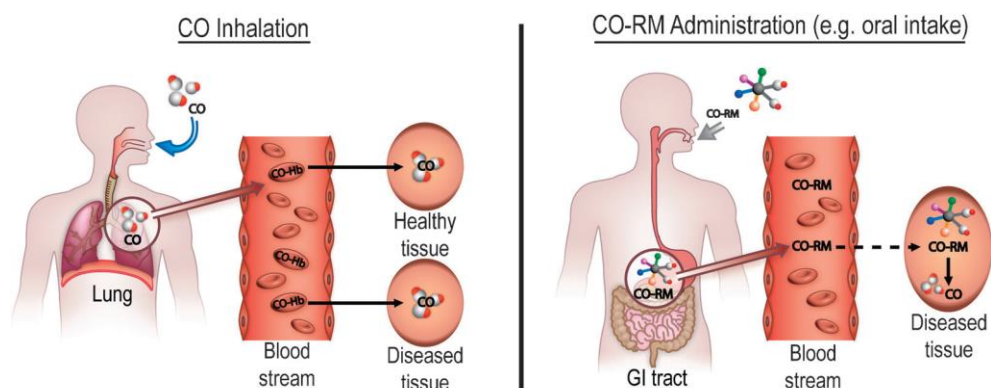


**Figura 5:** Aparelho desenvolvido especificamente para terapia com monóxido de carbono por inalação, aparelho de distribuição Covox DS desenvolvido por Ikaria.

Todavia existem ainda algumas questões acerca da aplicabilidade do CO inalado como agente terapêutico, tais como: se os valores de COHb são a medida correta da exposição a CO e por conseguinte um bom marcador para a intoxicação por CO; qual a duração da exposição ao CO e os níveis de COHb que podem conferir eficácia ao tratamento; a impossibilidade de direcionar o CO para o tecido lesado; e se uma dose pré-definida de CO pode ser utilizada para múltiplas indicações.

Estas questões associadas a dificuldades como o custo do equipamento e a necessidade de técnicos e instituições especializadas têm estimulado o *design* de moléculas

que podem ser utilizadas por via parentérica ou por via oral para a libertação de CO, como se encontra ilustrado na **Figura 6**.



**Figura 6:** Via alternativa para a libertação terapêutica de CO para os tecidos lesados (adaptado da referência 36).

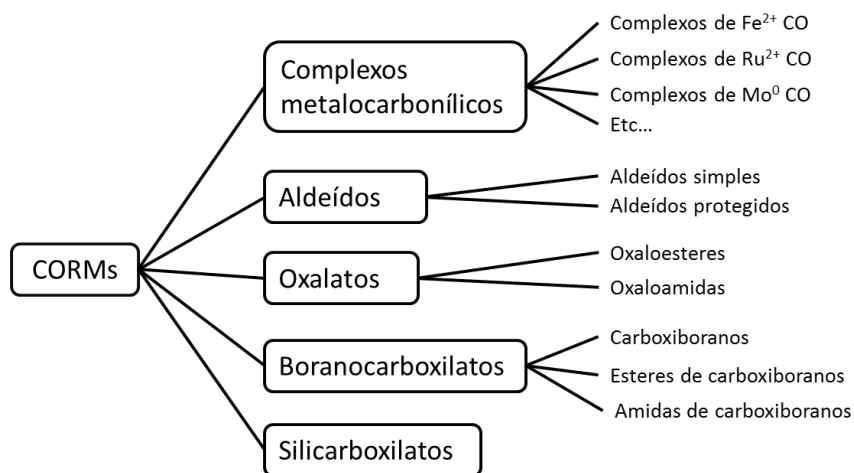
Estas duas vias apresentam algumas diferenças fundamentais; a administração de CO na forma de CO-RMs apresenta uma maior especificidade em relação aos tecidos alvo sendo necessário uma menor quantidade de CO (36). A especificidade nos tecidos pode ser controlada pela variação química das drogas e no caso de a administração ser feita oralmente ou por injeção, não são necessários outros equipamentos para a administração reduzindo assim os custos deste procedimento (16).

Como gás, o CO, difunde livremente e atravessa todas as membranas, passando por recetores e transportadores, podendo rapidamente mediar mudanças funcionais na célula. Os alvos proximais do CO encontram-se na superfície celular ou perto dela. Os distais incluem a mitocôndria e fatores de transcrição contendo hemo como por exemplo, BACH1 e NPAS2 (36).

## 1.2. Moléculas libertadoras de CO (CORMs)

Como alternativa à administração de CO por inalação, no início do ano de 2002 Motterlini e os seus colaboradores sugeriram o uso de moléculas libertadoras de CO (CORMs) para a libertação de CO em condições fisiológicas, como agentes terapêuticos. Assim, os CORMs são moléculas capazes de transportar e fornecer a quantidade correta de CO a tecidos lesados, podendo ser considerados pró-fármacos que sob estimulação libertam CO como princípio ativo (37, 38).

Poucos agentes farmacêuticos são compostos organometálicos, em parte devido à reatividade dos metais com substâncias biológicas e também devido à toxicidade associada a grande parte dos metais (36). Assim, tornou-se relevante a procura de outras classes de compostos que pudessem atuar como transportadores de CO ou que pudessem ser convertidos em CO em condições biológicas (36). Para além de compostos organometálicos, quatro classes de compostos que podem libertar CO foram identificadas:  $\alpha,\alpha$ -dialquilaldeídos; oxalatos; borocarboxilatos e silicarboxilatos, como demonstrado na **Figura 7**, com respetivos exemplos de cada uma das classes.



**Figura 7:** Classes de compostos para os quais foram reportadas condições experimentais que levam à libertação de CO (adaptado da referência 36).

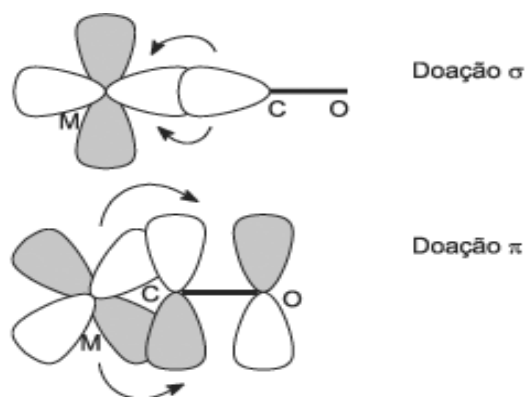
No entanto, os oxalatos e os  $\alpha,\alpha$ -dialquilaldeídos possuem baixa velocidade de libertação de CO, sendo ainda que os últimos possuem alguma toxicidade associada. Assim, existem algumas limitações relacionadas com o desenvolvimento deste CO-RMs a partir destas classes de compostos. Os borocarboxilatos são bastante conhecidos por serem bons libertadores de CO, no entanto, possuem uma esfera de ação limitada, tornando-os pouco adequados para a criação de compostos farmacológicos (36). Por outro lado, os ácidos silicarboxílicos ( $R_3SiCOOH$ ) têm sido usados como CO-RMs na administração de quantidades estequiométricas de CO em transformações catalisadas pela platina (36). O uso de altas temperaturas ou de bases fortes para ativar estas moléculas sugere que poderá existir alguma incompatibilidade com sistemas biológicos. Complexos organometálicos poderão constituir a classe mais adequada para atuar como transportadores de CO, tornando-se bastante relevante a criação de CO-RMs farmacológicos que sejam estáveis a condições ambiente, na presença de água e oxigénio e que possuam um comportamento farmacêutico apropriado (36).



Os complexos metalocarbonílicos são moléculas compostas por grupos carbonilo, um ou mais ligandos (iões ou moléculas) que se encontram ligados a um átomo no centro metálico (M= Mo, Ru, Mn, Fe, V, Co, Cr, Ir, W) (16). Estes compostos têm portanto a seguinte fórmula geral  $[M_m(CO)_xL_y]^{z\pm}[Q^{\pm}]_z$ , onde:

- M= metal de transição;
- L= o(s) ligando(s);
- Q= contra ião;
- z= carga geral do complexo (se z=0 o contra ião não existirá);
- m, x e y= coeficientes estequiométricos onde m e x têm de ser  $\geq 1$  (36).

Nestes complexos o monóxido de carbono liga-se ao ião do metal de transição, que se encontra no centro da molécula, com dois tipos distintos de interação de transferência de carga, de acordo com o modelo de Dewar-Chat-Duncanson, onde inicialmente ocorre a  $\sigma$ -doação do par de eletrões do carbono para a orbital *d* do metal, por consequência há a retro-doação parcial dos eletrões da orbital *d* do metal para a orbital antiligante do CO. A combinação dessas duas interações resulta numa ligação dupla parcial entre o monóxido de carbono e o ião metálico (representação esquemática ilustrada na **Figura 8**) (36).



**Figura 8:** Representação esquemática das orbitais moleculares envolvidas no efeito sinérgico de transferência eletrónica entre um metal de transição M e o ligando CO.

A escolha dos ligandos é também um passo importante no desenvolvimento de novos CORMs, uma vez que, estes determinam o comportamento do complexo organometálico, tal como a estabilidade através do estado de oxidação do metal e o rácio de dissociação do CO. No entanto a escolha do ligando é comprometida pelo metal que se encontra no centro do complexo e pelo seu estado de oxidação (36).

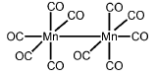
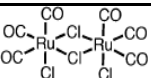
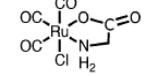
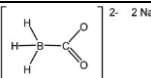
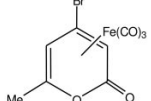
Os CORMs têm de apresentar alguns requisitos para a sua utilização ser viável, tais como: solubilidade em meio aquoso, toxicidade baixa ou nula destas moléculas assim

como dos produtos e ainda uma libertação controlada de CO despoletada por ação química ou física (39). O desenvolvimento destes compostos permitiu responder a algumas das questões levantadas com o uso CO por inalação com fins terapêuticos, isto é, o desenvolvimento dos CORMs permitiu o cálculo de doses exatas a serem administradas aos pacientes tendo em conta a estrutura do CORM em utilização, bem como o direcionamento do CO para os tecidos lesados variando a estrutura química dos CORMs, ancorando estes compostos a biomoléculas alvo de recetores específicos (16) ou utilizando enzimas específicas dos tecidos lesados para a libertação de CO (40). Para além disso, o desenvolvimento destes compostos permitiu a ausência da intervenção de profissionais qualificados assim como a inexistência de utilização de equipamento.

Nos últimos anos foram estudados alguns CORMs, encontrando-se representados os principais exemplos na **Tabela 3**. O estudo dos CORMs iniciou-se com CORM-1 ( $Mn_2CO_{10}$ ) e CORM-2 (dímero  $[Ru(CO)_3Cl_2]$ ), formas lipossolúveis em que era utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização destas (41). Contudo estas formas apresentavam limitações: a sua solubilidade, uma vez que são insolúveis em água, propriedade essencial para o uso de CORMs como agente terapêutico; a necessidade de fotólise por parte do CORM-1 para a libertação de CO e ainda a libertação demasiado lenta de CO (42). De forma a ultrapassar a questão da insolubilidade em meio aquoso, foi estudado um outro CORM, o  $[Ru(CO)_3Cl-(glicinato)]$  (CORM-3). Estudos iniciais acerca deste complexo mostraram que este seria um composto passível de utilização como CORM, uma vez que demonstraram uma baixa toxicidade e ainda apresentaram propriedades vasodilatadoras e aumentaram a sobrevivência de ratos após transplante de coração (43). No entanto também este CORM apresenta desvantagens como, por exemplo, a libertação demasiado rápida de CO. Desta forma a pesquisa por agentes que possam ser utilizados como CORMs de forma segura em ambiente biológico continuou, identificando-se assim o boranocarbonato de sódio ( $[H_3BCO_2]Na_2$ ), também conhecido como CORM-A1). Este é um composto hidrossolúvel e liberta CO de forma mais lenta do que o CORM-3 e apenas em condições específicas (pH = 7.4, 37 °C, condições fisiológicas) (44). Desta forma foram realizados vários estudos utilizando o CORM-A1, este apresentou assim um papel ativo no sistema cardiovascular, propriedades anti-inflamatórias e mais recentemente foi testado o seu papel como protetor cerebral (42, 44, 45). Dada a grande perspetiva acerca dos CORMs, a pesquisa de novos complexos passíveis de utilização em condições

biológicas continuou (como é o exemplo do CORM-F3, representado na **Tabela 3**) e até à data muitos outros CORMs encontram-se descritos na literatura, no entanto para além dos estudos iniciais reportados pelos autores pouco mais se sabe acerca deles e das suas propriedades farmacológicas.

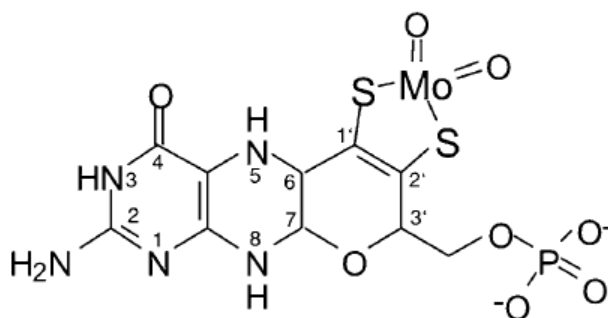
**Tabela 3: Propriedades farmacocinéticas e farmacológicas de CORMs.**

CORM	Libertação de CO		Solubilidade	Propriedades farmacológicas	Ref.
	T <sub>1/2</sub>	Mecanismo			
 <b>CORM-1</b>	Rápida (<1min)	Dependente da luz	Etanol e DMSO	-Vasodilatador	(46)
 <b>CORM-2</b>	Rápida (≈1min)	Induzida por substituição do ligando	Etanol e DMSO	-Anti-inflamatório	(47, 48)
 <b>CORM-3</b>	Rápida (≈1min, a pH = 7.4, 37 °C)	Induzida por substituição do ligando	Hidrossolúvel	-Efeito ionotrópico positivo -Vasodilatador	(43, 49)
 <b>CORM-A1</b>	Lenta (≈21min, a pH = 7.4, 37 °C)	Estritamente dependente do pH	Hidrossolúvel	-Vasodilatador -Protetor cerebral -Anti-inflamatório	(42, 44, 45)
 <b>CORM-F3</b>	Lenta (≈55min)	Induzida por oxidação	Etanol e DMSO	-Anti-inflamatório -Vasodilatador	(50)

O metal de transição escolhido para o centro metálico dos CORMs tem um papel importante, na medida em que este pode apresentar toxicidade para as células. Posto isto, uma vez que o molibdénio pertence ao grupo dos oligoelementos, ou seja tem um papel biológico essencial, este poderá ser um bom indicador do uso deste metal na formulação de novos CORMs.

### 1.3. CORMs de molibdênio

O molibdênio, metal utilizado em alguns CORMs, possui uma eletronegatividade de 1,3, e pode variar o seu estado de oxidação de 0, +2 a +6 formando uma variedade de complexos (51). Este é o metal de transição mais abundante nas águas dos oceanos (local onde existiram as primeiras formas de vida) sob a forma de molibdato  $[\text{MoO}_4]^{2-}$ , é um micronutriente essencial para animais, plantas e microrganismos onde faz parte do local ativo de certas proteínas, sendo mesmo o segundo metal de transição com papel biológico essencial. Do ponto de vista da biologia, o molibdênio pertence ao grupo dos oligoelementos, ou seja, o organismo necessita deste metal em quantidades diminutas. Este elemento se for encontrado em quantidades demasiado elevadas no organismo são observados alguns sintomas, por outro lado, a ausência deste metal causa a perda de funções metabólicas essenciais, podendo mesmo levar à morte do indivíduo (51, 52). Porém, mesmo que o molibdênio se encontre disponível na célula, este encontra-se biologicamente inativo até que se encontre complexado com a pterina tricíclica para formar o cofator molibdênio (Moco), representado na **Figura 9**, que é o composto ativo do local ativo de outras proteínas de molibdênio (51, 53).



**Figura 9:** Cofator molibdênio (Moco).

Na atualidade assume-se que não existe Moco na forma livre na célula, em vez disso, é sugerido que este é transferido, imediatamente após a sua síntese, para a apo-Mo-enzima (51). São conhecidas até à data mais de 50 enzimas que contêm Mo, em que a maioria ocorre em bactérias, nos eucariotas são conhecidas apenas seis (51). As enzimas que contêm molibdênio encontram-se divididas em três famílias, em que cada uma destas possui estrutura do local ativo e tipo de reação catalisada diferente, sendo elas a xantina oxidase, a sulfito oxidase e nitrato redutase, e finalmente a terceira família que é muito

diversa em estrutura e função mas todas contêm dois equivalentes do cofator pterina ligados ao metal (51). Nos eucariotas as enzimas que contêm Mo mais proeminente são: sulfito oxidase, que catalisam o último passo da degradação de aminoácidos que contêm o grupo sulfuroso; xantina desidrogenase, que está envolvida no catabolismo de purinas e espécies reativas de oxigénio (ROS); e por fim as aldeído oxidase, que oxida uma grande variedade de aldeídos (51).

Uma vez que o molibdénio desempenha um papel importante no organismo, tal facto será um bom indicador para o uso de CORMs que contenham no seu centro metálico este metal de transição, visto que a toxicidade do metal será diminuta quando em quantidades diminutas. Dependendo dos ligandos, o CO pode formar complexos de Mo que são cinética e termodinamicamente estáveis, e uma vez que, como referido anteriormente, o molibdénio possui estados de oxidação que podem variar de 0, +2 a +6, tais factos proporcionam uma ampla base para a procura de CORMs farmacologicamente aceitáveis (36). Por estas razões, alguns dos CORMs em estudo contêm este metal, tal como demonstrado na **Tabela 4**.

Tabela 4: CORMs com molibdênio no centro metálico, estudados até à data

Estrutura ou Nome	Estudos realizados	Conclusões	Ref.
$[\text{Mo}(\text{CO})_5(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et})]$	-Testes de libertação de CO por ensaios por mioglobina (2.5 equivalentes de CO por centro metálico).	-Libertação rápida e controlada de CO; -A incorporação de ligandos aminoácidos pode ser uma forma de regular e modular a libertação de CO.	(54)
<b>CORM-F4</b> <sup>a)</sup> <b>CORM-F10</b> <sup>b)</sup>	-Ensaio com mioglobina; -Doses tóxicas.	-CORM-F10 liberta mais CO do que o CORM-F4; -A dose tóxica do CORM-F10 é mais alta do que a dose necessária para detetar a libertação de CO; - CORM-F10 tem um efeito vasorrelaxador.	(55)
$[\text{NEt}_4][\text{MoX}(\text{CO})_5]$ (X = Br, I)	-Estudo das propriedades de libertação de CO do complexo metalocarbonílico	- A libertação de CO não é controlada pela força de ligação entre o metal e o carbonilo.	(56)
	-Estudos da ação antimicrobiana; -Foi testado a atividade bactericida em ensaios com Hb;	- ALF062 reduz visivelmente a viabilidade das bactérias estudadas -A toxicidade dos CORMs aumenta quando o crescimento ocorre em condições de baixa concentração de oxigénio.	(57)
$[\text{Mo}(\text{CO})_5(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3)]$	-Estudos do perfil de libertação de CO; -Testes de toxicidade; -Avaliação de parâmetros bioquímicos; -Análise dos estados de oxidação do Mo.	- A administração consecutiva do CORM leva a lesões do fígado; -Administrado consecutivamente o CORM causa lesões; -O Mo passou para estados de oxidação mais altos.	(58)
<b>Mo(CO)<sub>3</sub>(Histidinato)Na</b> <b>ALF186</b>	-Estabilidade; -Perfil de libertação de CO; -Estudo da interação com proteínas; -Estudo da toxicidade.	- Estável ao ar durante, à temperatura ambiente e no escuro; - ALF186 não possui citotoxicidade para linhas celulares dos rins e de macrófagos; no entanto reduz a sobrevivência da linha celular do fígado em 30%;	(59)
	-Análise dos principais alvos do CO; -Testes <i>in vivo</i> .	-Atenua a apoptose induzida; -ALF186 protege as células neuronais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da apoptose;	(60)

**Tabela 4: Continuação**

<b>Estrutura ou Nome</b>	<b>Estudos realizados</b>	<b>Conclusões</b>	<b>Ref.</b>
<b>Mo(CO)<sub>5</sub>(CNCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Li)</b> <b>ALF782</b> <b>Mo(CO)<sub>4</sub>(CNCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub></b> <b>ALF785</b> <b>Mo(CO)<sub>3</sub>(CNCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>3</sub></b> <b>ALF795</b>	-Testes de solubilidade; - Testes de citotoxicidade;	- ALF782, ALF785 e ALF795 são estáveis ao ar; - ALF795 para além de ser o CORM menos tóxico é também o que apresenta melhores resultados no tratamento de lesões agudas do fígado;	(61)
<b>ALF795, ALF818, ALF794, ALF863, ALF861, ALF835, ALF824, ALF825</b> <b>Mo(CO)<sub>3</sub>(CNCR'R''COOR''')</b>	-Avaliação parâmetros bioquímicos; - Perfil de libertação de CO; -Perfil distribuição do CORM.	-ALF794 é o primeiro composto que direciona e distribui CO no fígado com tão elevado grau de especificidade; -Os compostos estudados são candidatos a fármacos para a libertação de quantidades terapêuticas de CO.	(61)
<b>[Mo(CO)<sub>4</sub>(amina)<sub>2</sub>]</b>	-Testes de solubilidade; -Perfil de libertação do CO; -Estudos de toxicidade; -Índices hemolíticos.	-Solúveis em solventes orgânicos polares; -Complexos com aminas bidentadas como ligandos possuem um perfil de libertação de CO mais controlável -Os complexos estudados possuem índices hemolíticos demasiado elevados para aplicações terapêuticas.	(62)
<b>[Mo(CO)<sub>5</sub>Y]Q</b> <b>Y= Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup></b> <b>Q= [NR<sub>4</sub>]<sup>+</sup></b> <b>R=H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub></b>	-Níveis de TNF; -Estudos de toxicidade; -Perfil de libertação de CO; -Impacto de mortalidade.	-Complexos inibem a produção de TNF; -Libertação espontânea de CO; -Um dos compostos apresenta toxicidade;	(63)

a) [Mo(CO)<sub>3</sub>(η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(η<sup>1</sup>-O)-C=O)-O-CMe=CH-COMe=CH)]BF<sub>4</sub>

b) [Mo(CO)<sub>3</sub>(η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(η<sup>1</sup>-O)-C=O)-O-CMe=CH-COMe=CBr)]BF<sub>4</sub>

Posto isto, os complexos metalocarbonílicos em que o molibdénio é o metal de transição usado, são até à data dos CORMs mais estáveis, com menor toxicidade para o organismo, baixo custo e ainda de síntese mais simples (61). No entanto, existem algumas questões associadas ao uso terapêutico destes complexos, como a toxicidade, o tempo de libertação de CO e a reatividade deste com substâncias biológicas, entre outras, as quais se encontram descritas na **Tabela 4**. Deste modo foram desenvolvidos formas de

encapsulamento dos CORMs em matrizes sólidas, agora conhecidos como materiais libertadores de monóxido de carbono (CORMAs).

#### 1.4. Materiais libertadores de monóxido de carbono (CORMAs)

Como referido anteriormente, os complexos metalocarbonílicos são a classe de CORMs mais promissora, no entanto também esta classe possui inconvenientes no que diz respeito à sua utilização terapêutica. De entre os inconvenientes do uso dos CORMs é de destacar o facto de os metais presentes nestes complexos poderem reagir com substâncias biológicas (como por exemplo proteínas), o facto de certos CORMs apresentarem uma elevada solubilidade o que leva a uma distribuição destes por todo o organismo e em grandes quantidades podendo ser tóxico para tecidos saudáveis, pelo que estes permanecem os principais desafios no desenvolvimento de novos CORMs (61). Com o uso destes complexos existe ainda a possibilidade do metal ou até mesmo fragmentos dos ligandos possuírem atividade biológica (39). De forma a tentar eliminar algumas dos inconvenientes descritos anteriormente foram desenvolvidos materiais libertadores de CO (CORMAs), que são combinações de CORMs com diversos suportes (64). Até à data foram desenvolvidos CORMAs com os seguintes suportes: micelas poliméricas, polímeros, nanopartículas de sílica ou nanodiamantes, metalodendrímeros e finalmente as ciclodextrinas, as quais ainda não foram testadas em meio biológico (64). Atualmente ainda é muito limitada a investigação em CORMAs, no entanto são já conhecidas algumas vantagens do uso destes híbridos, nomeadamente a redução da toxicidade e a libertação controlada de CO. Todas os híbridos conhecidas até ao momento assim como as suas vantagens e desvantagens encontram-se descritas na **Tabela 5**.



**Tabela 5: Suportes sólidos utilizados até à data para encapsulação de CORMs.**

<b>Suporte</b>	<b>CORM</b>	<b>Forma de Síntese</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Ref.</b>
Micelas Poliméricas	$Ru(CO)_3CIL$ (L=glicinato)	Blocos	-Diminuição drástica da toxicidade do metal; -Libertação controlada de CO - Facilidade em direcionar o fármaco - Tamanho correto para entrada nos nódulos linfáticos	- Necessidade do grupo tiol para que haja a libertação de CO (enzimas).	(65)
Polímero	$Mn(CO)_3L$ (L=ligando tridentado de azoto)	Precipitação	-Libertação controlada de CO; -Maior quantidade de CO libertado pode ser induzida por irradiação.	-Nem todos os polímeros conjugados com os complexos diminuem ou erradicam a toxicidade do metal.	(66)
Nanopartículas de $SiO_2$ ou nanodiamantes (ND)	$[Mn(CO)_3(tpm)]$ (tpm = tris(pirazolil) metano)	Co-polimerização	- Síntese simples; - Biocompatível; - Facilidade de controlo de tamanho; - Facilidade de direcionamento -Reduzem a exposição sistémica;	-Apesar do longo tempo de reação, esta não é completa	(67)
Metalodendrímeros	$MnBr(CO)_3(Bipy)$ (Bipy= Biperidina substituída)	Reação de condensação de base de Schiff	-Maior interação entre o conjugado dendrímero-fármaco e as células alvo; -Ativados a comprimentos de onda mais elevados (410 nm). -Libertação mais rápida de CO em comparação com outros photoCORMs -Estáveis em solução.	-Não foi testada ainda a sua atividade biológica em sistemas celulares; -mesmo com comprimento de onda superior, ainda é demasiado baixo para ser utilizado como fármaco (>600nm)	(68)

Tabela 5- Continuação

Suporte	CORM	Forma de Síntese	Vantagens	Desvantagens	Ref.
Peptídeo anfifílico (PA)	$\text{RuCl}(\text{CO})_3\text{L}$ (L= glicinato)	Reação de um polímero pré existente com $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$	-Biodegradável; -Capacidade de formar géis robustos; -Aumento do tempo de semi-vida do CORMA quando gelificado; -Capacidade de direcionar o CORMA, usando a administração intravenosa.	-Difícil purificação.	(69)
Ciclodextrinas	$\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{Cl}$ e $\text{CpMo}(\text{CO})_3\text{Cl}$	Métodos adaptados	Não foi testado em sistemas biológicos		(70)
Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs)	$[\text{Mo}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}(\text{CO})_2(2,2'\text{-bipiridina-5,5'\text{-dicarboxilato})]$	Co-precipitação	Não foi testado em sistemas biológicos		(71)
	$\text{CpMo}(\text{CO})_3\text{CH}_2\text{COOH}$	Co-precipitação		(72)	
	$(\text{TBA})_2[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{bpdc})]$			(73)	

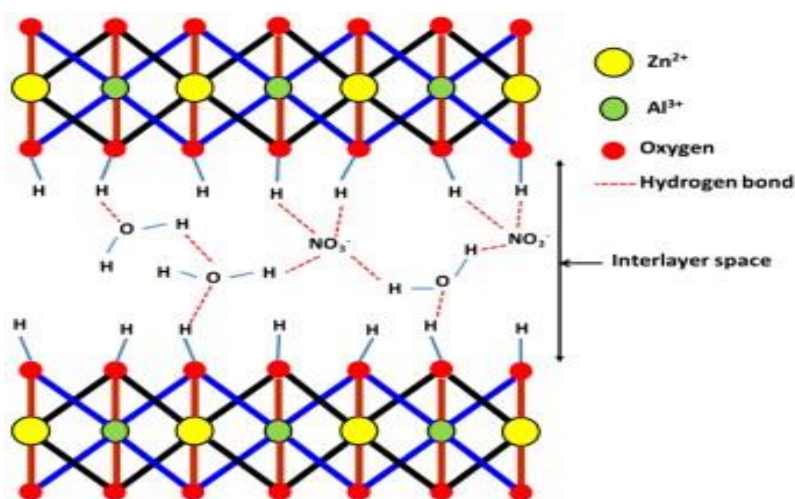
Com o desenvolvimento destas combinações foi possível aumentar as propriedades farmacocinéticas, das seguintes formas: evitando a rápida eliminação pelos rins, direcionando para os órgãos que são capazes de capturar nanopartículas tal como o fígado e tumores de rápido crescimento, e finalmente usando ligandos de direcionamento (64). No entanto, para além de existirem registos da intercalação de alguns complexos carbonílicos em hidróxidos duplos lamelares (LDHs), não existem estudos deste tipo de híbridos em sistemas biológicos (71-73).

### 1.5. Hidróxidos Duplos Lamelares (LDHs)

Os hidróxidos duplos lamelares, também conhecidos como argilas aniónicas ou como materiais do tipo hidrocalcite, encontram-se naturalmente nos minerais ou são uma classe de nano-estruturas sintéticas (74). A sua forma sintética foi sintetizada pela primeira vez em 1942 por Feitknecht, em que colocou soluções aquosas de metais a reagir com base, no entanto a primeira caracterização destes materiais surgiu pela primeira vez nos anos 90 por Allmann, Taylor e os seus colaboradores (75). Os LDHs consistem em lamelas carregadas

positivamente intercaladas com aniões, desta forma a composição destes matérias pode ser expressa pela seguinte fórmula geral:  $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]^{x+} (A^{n-})_{x/n} \cdot zH_2O$  onde  $M^{2+}$  e  $M^{3+}$  são, respetivamente, iões metálicos divalentes (por exemplo:  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , etc) e trivalentes (por exemplo:  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ , etc), x será igual ao rácio molar de  $M^{2+}/(M^{2+} + M^{3+})$  e que normalmente se encontra no intervalo 0.2-0.33, e  $A^{n-}$  será o anião intercalado nas lamelas (74, 76). Desta forma, as lamelas encontram-se organizadas da seguinte forma: cada catião encontra-se cercado por seis iões hidroxilo formando uma subunidade octaédrica, o que confere uma carga positiva às lamelas que será contra balanceada com cargas aniónicas entre as camadas (74, 77). Cada subunidade partilha entre si duas arestas e pode expandir-se na camada bidimensional, na teoria, infinitamente (77).

Na **Figura 10**, a título ilustrativo, está representado um LDH-Zn,Al. No espaço interlamelar estão presentes os aniões nitratos (78).



**Figura 10:** Representação de LDH-Zn,Al (adaptado da referência 72)

Existem quatro abordagens para a síntese de LDHs: troca aniónica, método de reconstrução, reação térmica ou por co-precipitação. A síntese por troca aniónica é o método mais comum para a preparação de LDHs, no entanto não é um método de síntese propriamente dito, mas uma modificação pós-síntese, uma vez que é necessário um LDH precursor. O LDH precursor mais apropriado é o LDH que contém aniões nitrato, devido à facilidade com que estes aniões são removidos do espaço interlamelar. Em geral, esta reação ocorre colocando o LDH precursor numa solução aquosa contendo um excesso do anião a ser intercalado, pelo que a viabilidade deste processo depende das interações

electroestáticas entre os aniões e as lamelas (75, 79, 80). Uma grande variedade de moléculas foi já intercalada em LDHs pelo método de troca iónica, de entre as quais se destacam porfirinas, ftalocianinas entre outras (75, 81). O método de reconstrução, também conhecido como reidratação de um precursor LDH calcinado, baseia-se no efeito de memória (LDHs que sofreram calcinação a temperaturas moderadas têm a habilidade de voltar à estrutura de lamelar quando colocados na solução do anião a intercalar) (75). Inicialmente é preparado um LDH com o carbonato intercalado, que quando sofre calcinação é removido como  $\text{CO}_2$ . O produto formado (óxido) é colocado na solução que contém o anião a ser intercalado, normalmente em concentrações muito superiores ao coeficiente estequiométrico da reação (75, 82). O facto de este método prevenir a incorporação de contra aniões inorgânicos competitivos é uma vantagem no uso neste método de síntese relativamente aos restantes (75). Como moléculas intercaladas em LDHs por este método temos como exemplo ftalocianinas, e o naftalenocarboxilato (75). O método de reação térmica é uma abordagem mais recente na síntese de LDHs. Este método consiste no aquecimento de uma mistura do LDH precursor e do anião a ser intercalado, a uma taxa de  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , até temperaturas elevadas, deixando a reagir durante algumas horas e de seguida arrefecido à temperatura ambiente (83). Finalmente o método de direto por co precipitação é o mais usado na síntese de LDH. Este processo de síntese consiste na adição lenta da solução que contém sais dos catiões metálicos nas proporções molares adequadas e de uma solução alcalina para manter o pH adequado para um reator onde se encontra água (72). O pH deve ser seleccionado para que ocorra a precipitação da solução no reator, e por forma a manter o pH constante normalmente é adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) (72, 75). No caso de não existir um controlo do pH pode ocorrer a formação de impurezas como  $\text{M}(\text{OH})_2$  e/ou  $\text{M}(\text{OH})_3$  e como consequência a formação de LDH com rácios  $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$  indesejáveis (75). O anião que é introduzido deve ter maior afinidade para com as camadas, caso contrário os contra-aniões do sal do metal pode ser incorporado no LDH contaminando-o (75). Este método tem a vantagem de permitir um controlo mais preciso da densidade de carga (rácio  $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$ ) nas lamelas do LDH formado (75).

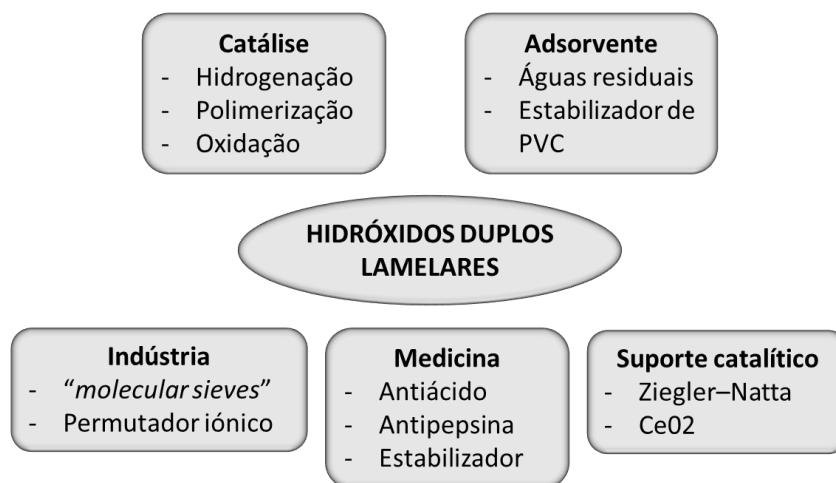
No entanto existe um problema comum a todos os métodos, a contaminação com carbonatos. Esta é uma contaminação a evitar uma vez que este anião é prontamente obtido através do  $\text{CO}_2$ , e uma vez intercalado este mantém-se firmemente no espaço interlamelar.

Como consequência, para evitar este tipo de contaminações estas sínteses são realizadas com água desionizada e decarbonatada e sob uma atmosfera de azoto (75).

Os LDHs são uma família de materiais que tem captado a atenção nos últimos anos pela sua capacidade de troca aniônica e pela sua capacidade de captar aniões orgânicos e inorgânicos, o que os torna em materiais inorgânicos quase únicos (74). Desta forma os LDHs têm um grande número de aplicações práticas, tais como: catálise, adsorção, fotoquímica, eletroquímica, farmacêutica, tratamento de águas entre outras (74).

### 1.6. Aplicações dos Hidróxidos Duplos Lamelares

Características como um baixo custo de síntese, propriedades facilmente adaptadas às necessidades e uma grande versatilidade tornam os hidróxidos duplos lamelares materiais destinados a satisfazer necessidades específicas, assim como materiais com inúmeras aplicações, como exemplificado na **Figura 11** (84).



**Figura 11: Principais aplicações industriais dos LDHs (adaptado da referência 79)**

A aplicação mais comum destes materiais é atualmente a catálise uma vez que apresenta características como uma síntese simples e de baixo custo, e ainda é uma fonte versátil e reciclável de uma variedade de suportes catalíticos, precursores catalíticos ou o próprio catalisador (85). Estes materiais têm despertado um especial interesse também na bioquímica, na medida em que permite a intercalação de moléculas importantes do ponto de vista biológico, tais como porções de ácido desoxirribonucleico (DNA), aminoácidos ou

enzimas, adenosina trifosfato (ATP) e vitaminas, de modo a estabilizá-las (86-89). Temos como exemplo de aplicação a imobilização em LDHs de enzimas ou proteínas, que podem atuar como catalisadores seletivos, assim como sistemas de distribuição.

No entanto a sua utilização na área da biomedicina tem ganho uma grande importância nos últimos anos, nomeadamente no que respeita a formulações farmacêuticas, embora ainda se encontre num estado preliminar. As propriedades descritas anteriormente associadas ao efeito de memória destes materiais (capacidade de estes materiais voltar à estrutura inicial quando colocado em solução com aniões), à capacidade de troca iónica, à baixa toxicidade em sistemas biológicos, à capacidade de proteção do fármaco de possíveis fontes de degradação (radiação, calor e oxigénio), à biocompatibilidade, ao carácter alcalino destes e à capacidade de controlar a libertação do fármaco sugerem que estes materiais podem ter um futuro promissor no que diz respeito ao direcionamento e libertação de fármacos, abrindo amplas possibilidades para a pesquisa e desenvolvimento da sua aplicação clínica (90-92). O desenvolvimento deste tipo de materiais permitiu responder a alguns problemas apresentados por sistemas de encapsulamento tradicionais, tais como a degradação do fármaco por sistemas enzimáticos, baixa biodisponibilidade, estabilidade na circulação sanguínea e ainda a eficiência do transporte do fármaco (91).

Nos anos 80, surgiram reportadas as primeiras aplicações dos LDHs, onde se encontravam descritas as suas potencialidades como agentes antiácidos e anti-pepsina, mais tarde, em 1992, estes materiais foram sugeridos para a remoção de aniões fosfato do fluido gastrointestinal com o objetivo de prevenir a hiperfosfatémia (85, 93). A tendência na tecnologia farmacêutica tem em vista formulações que sejam capazes de manter os níveis de fármaco ativo por longos períodos, de forma a evitar a repetição da administração (74). Visto isto, os LDHs têm surgido com uma grande significância na área farmacêutica, na medida em que vários fármacos foram já intercalados nestes mesmos materiais, como demonstrado na **Tabela 6** (94, 95).

Tabela 6: Resumo dos fármacos intercalados em LDHs, alguns exemplos e vantagens.

Ação do Fármaco	Fármaco	Matriz do LDH	Vantagens	Ref.
<b>Anti-inflamatório não esteroide</b>	-Fenbufeno; -Naproxeno; -Flurbiprofeno; -Diclofenac; -Etc.	Mg, Al; Al, Li.	-Aumento da solubilidade; -Controlo da libertação; -Diminuição dos efeitos secundários no trato gastrointestinal.	(95)
<b>Antibióticos</b>	-Amoxicilina; -Anfotericina B; -Ampicilina; -Benzilpenicilina; -Benzoato; -Cloranfenicol; -Etc.	Zn,Al; Zn,Mg,Al; Mg,Al.	-Libertação lenta do fármaco; -Libertação específica do fármaco nas membranas biológicas; -Mais estável.	(94)
<b>Agentes Anticancerígenos</b>	-10-Hydroxi camptotecina; -Floxuridina; -Ifosfamida; -Doxifluridina; -Etc.	Mg, Al; Zn, Al.	-Perfil favorável da depuração do sangue; -Aumento do tempo de vida do fármaco; -Acumulação nos tecidos tumorais; -Biocompatível.	(94)
<b>Anti cardiovascular</b>	-Pravastatina; -Bezafibrato; -Fluvastatina; -Etc.	Mg, Al; Li, Al.	-Aumento da estabilidade.	(94)
<b>Anticoagulantes</b>	-Heparina.	Mg, Al.	-Permite estabelecer uma dose terapêutica.	(94)
<b>Anti fibrinolíticos</b>	-Ácido tranexâmico	Zn, Al.	-Libertação lenta.	(94)
<b>Anti-hipertensivos</b>	-Enalapril; -Lisinopril; -Prasozina; -Etc.	Mg, Al; Zn, Al.	-Libertação controlada.	(94)
<b>Antimicóticos</b>	-5-Fluorocitosina.	Zn, Al.	-Libertação mais lenta e controlada.	(94)
<b>Antioxidantes</b>	-Carnosina; -Ácido vanílico; -Ácido gálico; -BHPPA.	Zn,Al; Mg,Al	-Rápida libertação inicial permite cálculo da dose terapêutica.	(94)
<b>Diabetes</b>	-Gliclazida.	Zn,Al,Cr.	-Aumento da solubilidade.	(94)
<b>Corticosteroides imunossuppressores</b>	-Prednisona.	Mg,Al.	-Aplicação num largo espetro de pH.	(94)

Com estudos efetuados é ainda possível verificar que diferentes métodos de síntese destes materiais levarão a um comportamento farmacológico diferente do híbrido LDH-

fármaco, provavelmente devido às diferentes propriedades físico-químicas (94). A taxa de libertação do fármaco é controlada pela interação entre o LDH e o composto a intercalar, pela rigidez das lamelas e tamanho do percurso para a difusão (74).

No que respeita ao *uptake* celular dos LDHs, ponto fulcral para o estudo da farmacocinética destes materiais, pensa-se que pelo facto de as lamelas possuírem carga positiva poderão ser atraídas pela membrana celular que possuem carga negativa, possibilitando a passagem do LDH para o interior da célula (96). Para confirmação da formação das vesículas endocíticas, características deste tipo *uptake* celular, foi aplicada a técnica de microscopia de transmissão eletrónica (TEM) (97). Mais tarde para determinar a via endocítica pela qual o LDH entra nas células, os investigadores bloquearam as vias mediadas por clatrina e a caveolina (recetores endocíticos) utilizando clorpromazina e nistatina, respetivamente (98, 99). Uma vez que o tratamento com clorpromazina levou à não formação de vesículas endocíticas, enquanto o tratamento com nistatina não produziu qualquer efeito, os investigadores concluíram que o mediador envolvido no *uptake* destes materiais será o clatrina (98, 99). Desta forma a entrada dos LDHs para o interior celular ocorre por via endocítica, mediada por clatrina.

Em suma, os LDHs representam uma das classe de materiais mais promissora, como consequência do seu baixo custo e do grande número de combinações composição/preparação que podem ser adotadas. Devido à sua grande versatilidade podemos afirmar que ainda algumas aplicações deste material se encontram por explorar, pelo que no futuro inúmeros estudos com estes materiais continuarão a surgir.

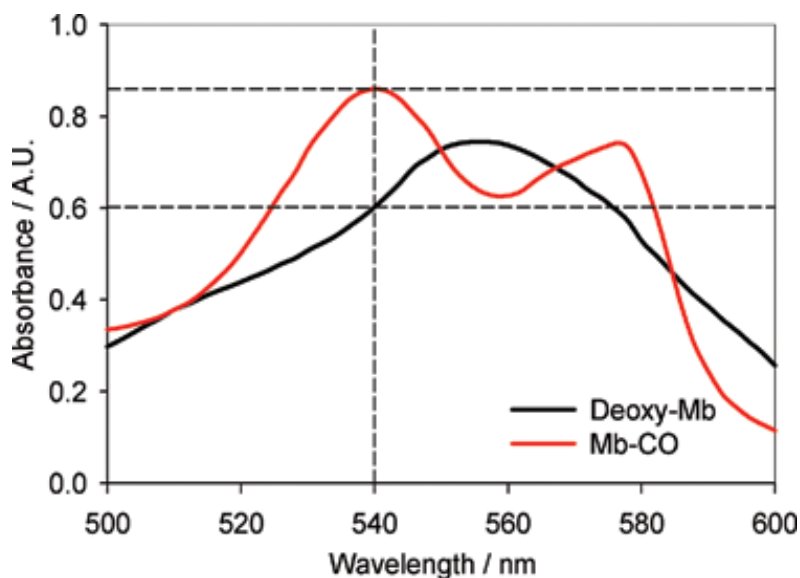
### **1.7. Detecção da libertação de CO**

O desenvolvimento de CORMs, assim como de CORMAs e o estudo destes pró-fármacos requer medidas precisas, exatas, sensíveis e relativamente convenientes de CO libertado nas matrizes gasosas, líquidas e não-líquidas existentes em organismos vivos (100). No processo de quantificação vários parâmetros devem ser controlados, incluindo a solução em que se desenvolve o ensaio, a temperatura, bem como a presença de oxigénio e/ou luz, que podem influenciar diretamente o rácio de libertação de CO (64). De modo a possibilitar a quantificação de CO foi necessário o desenvolvimento de algumas técnicas, de entre as quais se destacam as seguintes pelo número de utilizações: medição de CO



ligado à hemoglobina no sangue utilizando um oxímetro, espectrofotometria, espectroscopia de absorção no infravermelho, eletroquímica, cromatografia gasosa, detetor de ionização da chama (FID), espectrometria de massa e ainda detecção de gás reduzido (GC-RCP) (100).

O método de carbonilação da desoximioglobina (método espectrofotométrico), dos mais utilizados atualmente, foi descrito pela primeira vez para a quantificação do CO libertado pelos CORMs em 2002 por Motterlini *et al.*, com base na premissa de que se um complexo liberta CO, este será capaz de converter a desoximioglobina em carboximioglobina (COMb) (37). Este método consiste na avaliação das alterações que ocorrem nas bandas Q do grupo heme da mioglobina (Mb) e da COMb, representadas na **Figura 12** (100).



**Figura 12:** Espectro UV/Vis das bandas Q do grupo heme da desoximioglobina (Deoxy-Mb) e da carboximioglobina (COMb) (Retirada da referência 101).

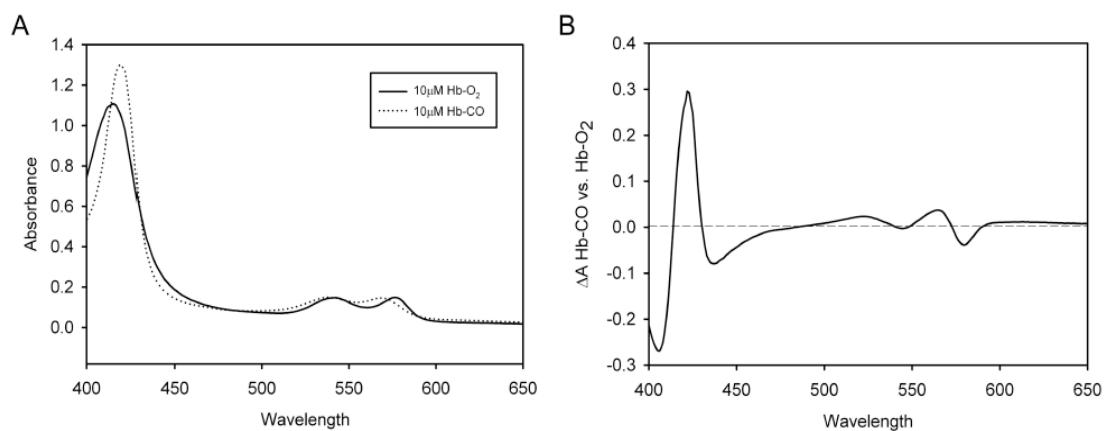
Neste tipo de ensaios a desoximioglobina (deoxy-Mb) é utilizada como aceitadora do CO libertado pelos CORMs dando origem à COMb, a carboximioglobina formada é quantificada e diretamente correlacionada com a quantidade de CO libertado pelos CORMs (102, 103). Neste tipo de ensaios, realizados a temperatura ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pH ( $\text{pH}=7.4$ ) fisiológico, são monitorizados as alterações na absorvância a 540 nm, onde a proporção de deoxy-Mb que foi convertida em COMb pode ser determinada. Tendo como referência os espectros *standard* deoxy-Mb e a COMb (que é obtido borbulhando a solução

de deoxy-Mb com gás 100% CO) e a concentração total de Mb (obtida a partir do coeficiente de extinção da COMb a 540nm, a concentração de COMb formada pode ser determinada, que corresponde à quantidade de CO libertado pelo CORM ao longo do tempo (101).

Embora o método de quantificação de CO com mioglobina seja o mais usual, em certos casos existem sérios problemas associados, como a insolubilidade dos CORMs em ambientes aquosos causando a turbidez da solução, o facto de o CORM poder interferir no valor da absorvância apresentado, o agente redutor utilizado (usualmente o ditionito de sódio) poder influenciar a libertação de CO, o facto de a mioglobina não ser estável em solução durante longos períodos de tempo e por fim o facto de no organismo humano esta proteína se encontrar apenas no músculo-esquelético e cardíaco. Posto isto, os dados obtidos a partir deste tipo de ensaios não são credíveis para perfis de libertação de CO.

Mesmo com o desenvolvimento de novos métodos, continuam a existir alguns problemas no que se respeita à interferência de certos reagentes utilizados durante o procedimento experimental. Tal como McLean e o restante grupo provaram, a presença do agente redutor (ditionito de sódio), mais precisamente o grupo sulfito deste, influencia a libertação de monóxido de carbono (104). De forma a tentar colmatar esta falha, este mesmo grupo desenvolveu novos métodos para traçar os perfis de libertação de CO dos CORMs. Inicialmente foi testada uma pequena adaptação do método original, em que o agente redutor (ditionito de sódio) era retirado da solução, no entanto, todo o procedimento experimental teria de decorrer em condições de anóxia o que seria difícil de manter e seria necessário equipamento especializado. Estas questões levaram ao desenvolvimento de um outro método muito semelhante, em que a proteína usada deixou de ser a mioglobina passando-se a usar a hemoglobina (Hb). O uso da hemoglobina no lugar da mioglobina em condições normóxicas não irá de alguma forma afetar os resultados uma vez que, ao contrário da mioglobina, a hemoglobina tem uma afinidade superior para o CO comparativamente à afinidade que tem para o O<sub>2</sub>, pelo que não é necessário a desoxigenação da hemoglobina reduzida de forma a medir a cinética de libertação de CO (105). Neste método os espectros de absorção da oxihemoglobina (Hb-O<sub>2</sub>) e da carboxi-hemoglobina (COHb) são monitorizados na região de Soret (pico intenso na região do comprimento de onda do azul no espectro do visível ≈400 nm) medindo a diferença entre as espécies a um comprimento de onda de 422 nm, que se encontra entre dois pontos

isobésticos, tornando-o ideal para medir o deslocamento do oxigênio causado pelo CO, como demonstrado na **Figura 13** (104).



**Figura 13:** A) Espectro absoluto de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hb-O}_2$  (linha contínua) e 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{COHb}$  (linha pontuada). B) Espectro de diferença de  $\text{COHb}$  e  $\text{Hb-O}_2$ , linha pontuada indica onde a diferença entre  $\text{COHb}$  e  $\text{Hb-O}_2$  é igual a zero (Retirada da referência 104).

No entanto persistem ainda questões associadas ao uso deste método tais como a influência da luz na libertação de CO (fotoCORMs) que é impossível de ultrapassar com este tipo de métodos (métodos espectrofotométricos) e ainda o facto de este ser um método pouco sensível dificultando a quantificação de quantidades demasiado baixas de CO libertado, pelo que nestes casos é necessário a aplicação de outros métodos de quantificação de CO.

Um outro método utilizado para quantificação de CO libertado pelos CORMs consiste no uso de um oxímetro para medição da carboxi-hemoglobina formada (59). Este aparelho teve a sua primeira aplicação no diagnóstico clínico da exposição e toxicidade do CO (106). A determinação de COHb baseia-se na diferença dos valores de absorção de todos os derivados da hemoglobina e da COHb no sangue (100). Porém a precisão deste método é muitas vezes afetado pela possível presença de bilirrubina e/ou de hemoglobina fetal (107). Outras desvantagens deste método estão relacionadas com a falta de precisão e com a sua irreprodutibilidade a valores normais de hemoglobina total ( $\leq 2.5\%$ ) e ainda com a sua falta de sensibilidade (100).

Apesar de existirem outros métodos, o método de quantificação de CO mais sensível é por cromatografia gasosa equipado com um fotómetro redutor de composto (GC-RCP), com um aparelho como o apresentado na **Figura 14**, que deteta CO a concentrações tão baixas quanto 2 partes por bilião (ppb).



Figura 14: Cromatógrafo gasoso equipado com um fotómetro redutor de composto (GC-RCP).

Este método, desenvolvido por Vreman e os seus colaboradores (108), consiste na passagem da amostra gasosa através de uma coluna de GC-RCP. As amostras são tratadas de forma a que o CO libertado se encontre no espaço livre do vial onde se encontra a amostra, que é conectado ao aparelho de GC-RCP de forma a que se possa proceder à quantificação (109). Neste tipo de análise não é necessário a separação de compostos, uma vez que o detetor responde apenas a gases capazes de reduzir óxido de mercúrio (HgO) a mercúrio elementar (Hg), tais como o hidrogénio (H<sub>2</sub>) e o monóxido de carbono (109).

Apesar de existirem vários métodos para quantificação de CO libertado pelos CORMs grande parte deles apresenta desvantagens que podem comprometer os resultados obtidos. Com uma análise mais detalhada podemos concluir que o método mais apropriado para este tipo de análise será pela técnica de GC-RCP devido à sua precisão, exatidão, reprodutibilidade, seletividade e ainda pela sua versatilidade, sendo apenas necessário o aparelho desenvolvido para este fim.

## 1.8. Linhas Orientadoras do Trabalho

Nos últimos anos têm surgido várias patentes que relacionam o uso de hidróxidos duplos lamelares com a saúde, no entanto até à data ainda não surgiram estudos biológicos acerca da intercalação de CORMs nestes materiais.

Desta forma o objetivo deste trabalho consistiu na síntese do complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795) e respetiva intercalação em hidróxidos duplos lamelares do tipo LDH-Zn,Al. Os dois compostos (ALF795 e híbrido LDH-ALF795) foram caracterizados por técnicas de espectroscopia vibracional, análise elementar, difração de Raio-X de pós, RMN de estado sólido e em solução e ainda técnicas de análise térmica. Posteriormente, com estes dois compostos foram realizados estudos qualitativos e posteriormente quantitativos do rácio de libertação de CO, para possível comparação dos perfis de libertação de CO entre o ALF795 e o híbrido LDH-ALF795.

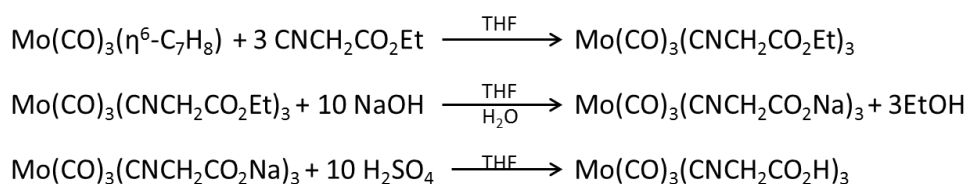


## 2. Resultados e discussão

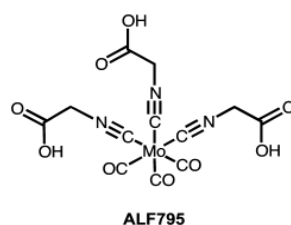
### 2.1. Síntese e caracterização de $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$ (ALF795)

Com o objetivo de posterior intercalação do complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795) em hidróxidos duplos lamelares procedeu-se inicialmente à síntese deste complexo de acordo com o **Esquema 1**.

#### Esquema 1- Preparação do complexo ALF795



O composto  $(\eta^6\text{-C}_7\text{H}_8)\text{Mo}(\text{CO})_3$  foi preparado por refluxo de cicloheptatrieno com hexacarbonilo de molibdênio em benzeno. A reação de  $(\eta^6\text{-C}_7\text{H}_8)\text{Mo}(\text{CO})_3$  com  $\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  seguida da adição de NaOH deu origem ao sal  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{Na})_3$ , que foi hidrolisado formando o complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795), ilustrado na **Figura 15**.



**Figura 15: Estrutura do complexo ALF795.**

O complexo ALF795 foi caracterizado por espectroscopia vibracional de infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de sólidos de  $^{13}\text{C}$  com rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e análise elementar. O espectro de infravermelho do complexo ALF795, representado na **Figura 16**, apresenta duas bandas com uma intensidade forte  $\nu(\text{CO})$  a  $1926$  e  $1853 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações antissimétricas e simétricas dos grupos carbonilos (61, 73). Neste mesmo espectro é ainda possível verificar a presença de duas bandas de forte intensidade a  $2184$  e  $2154 \text{ cm}^{-1}$  correspondente ao

estiramento  $C\equiv N$ , que se encontra de acordo com o reportado na literatura (61, 110). A banda a  $1714\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à vibração do estiramento do grupo carboxílico ( $C=O$ ) do ligando  $CNCH_2CO_2H$  (61).

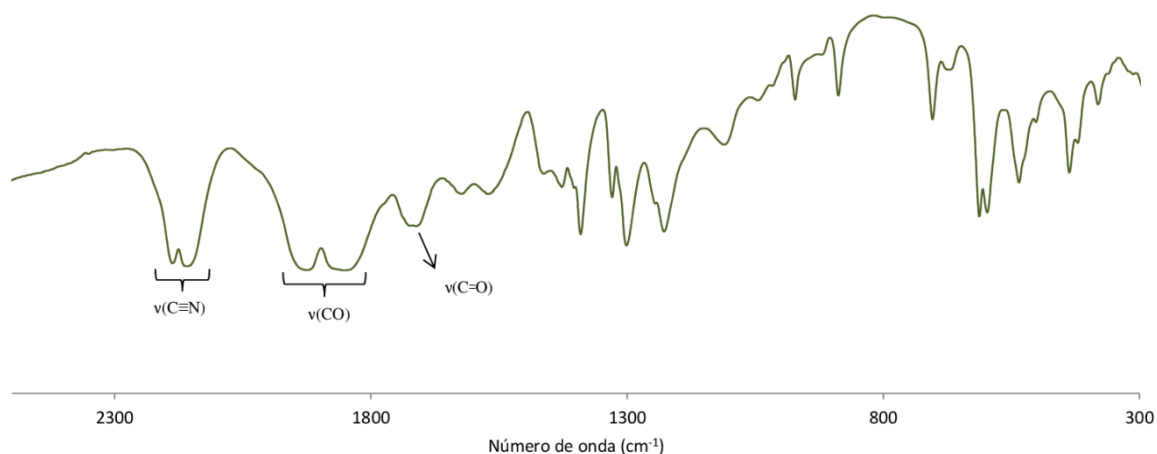


Figura 16: Espectro de IV (KBr) de ALF795. As bandas selecionadas encontram-se realçadas.

Devido à insolubilidade do complexo em estudo, o espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, representado na **Figura 17**, foi coletado na sua forma sólida. Analisando o espectro de  $^{13}\text{C}$  CP MAS do complexo ALF795 podemos afirmar que apresenta três picos (214.9, 215.9 e 217.2 ppm) correspondentes aos grupos carbonilo ( $C=O$ ), dois outros sinais a 170.1 e 172.6 ppm correspondente aos grupos nitrilo ( $C\equiv N$ ), um sinal correspondente aos átomos de carbono do grupo  $-COOH$  a 158.9 ppm e finalmente três outros picos a 45.2, 47.5 e 50.3 correspondentes aos átomos de carbono  $CH_2$ .

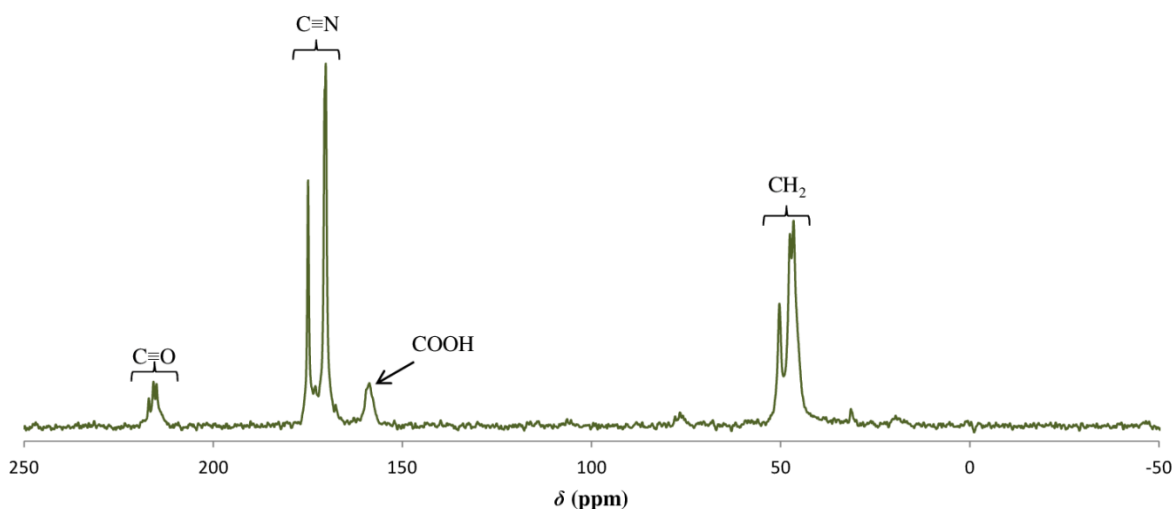


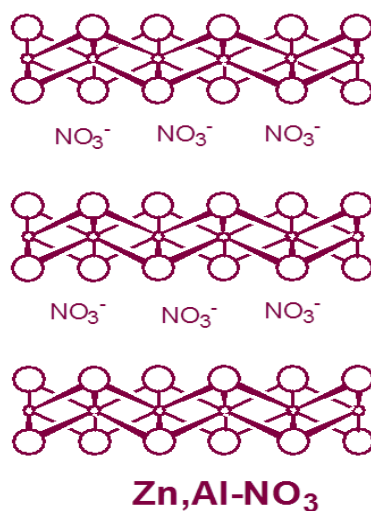
Figura 17: Espectro de  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR do complexo ALF795.



A estabilidade do complexo ALF795 foi investigada decorridos 5 meses após a sua preparação foi determinado novamente o espectro de IV, confirmando a integridade deste, o que nos permite afirmar que é composto estável quando colocado sob uma atmosfera de azoto e na ausência de luz. Os dados obtidos por RMN e IV para o complexo ALF795 encontram-se de acordo com os dados reportados na literatura (61).

## 2.2. Síntese e caracterização do material LDH-Zn,Al

O material LDH-Zn,Al, representado na **Figura 18**, foi sintetizado pelo método de co-precipitação, adicionando, gota a gota, a solução de metais (zinco e alumínio) à água ultra-pura decarbonatada e controlando o pH com uma solução aquosa de NaOH de forma a que este se mantenha entre os valores 7.5 - 8.0. De forma a confirmar o sucesso desta preparação, o sólido branco isolado foi caracterizado por IV, difração de Raios-X de pós e análise elementar.



**Figura 18:** Representação do material LDH-Zn,Al

Analisando o espectro de infravermelho do material sintetizado, representado na **Figura 19**, é possível observar uma banda forte a um número de onda de  $1384 \text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento antissimétrico em modo  $\nu_3$  dos íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (111). Neste mesmo espectro são ainda visíveis várias bandas a números de onda inferiores a  $750 \text{ cm}^{-1}$  ( $428$  e  $534 \text{ cm}^{-1}$ ) que são características deste tipo de material, e que correspondem às

ligações Zn-O e Al-O existentes nas lamelas, estando de acordo com o reportado na literatura para este tipo de materiais (112).

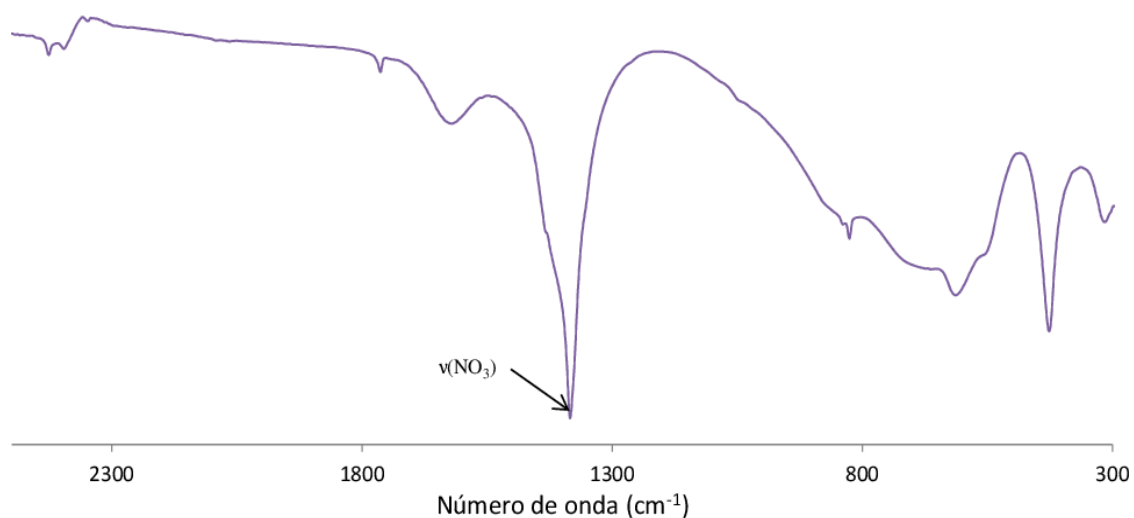


Figura 19: Espectro de IV (KBr) do material LDH-Zn,Al. As bandas selecionadas encontram-se realçadas.

Com o objetivo de mais tarde confirmar o sucesso da intercalação do complexo ALF795 em hidróxidos duplos lamelares, foi coletado, à temperatura ambiente, o difratograma do material LDH-Zn,Al. Uma análise cuidadosa do difratograma obtido, representado na **Figura 20**, revela bandas simétricas e igualmente espaçadas, características de hidróxidos duplos lamelares com elevada cristalinidade (113).

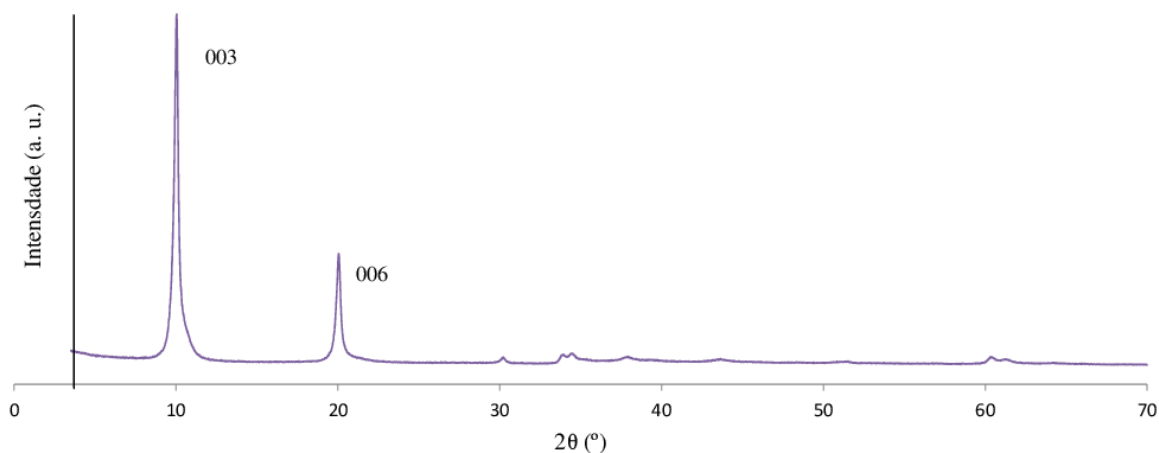


Figura 20: Padrões de Raio-X de pós do material LDH-Zn,Al.

A análise da reflexão 003 dá-nos a informação acerca do espaço interlamelar deste material, apresentando um valor de 8.77 Å, o que nos indica que os iões nitrato se encontram dispostos na diagonal (114).

### 2.3. Síntese e caracterização do material do material LDH-ALF795

Três estudos recentes efetuados pelo nosso grupo de investigação relatam a síntese de híbridos de LDHs contendo complexos organometálicos do tipo:  $[\text{Mo}(\text{alilo})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{bpdc})]^{2-}$  (115),  $[\text{CpMo}(\text{CO})_3\text{CH}_2\text{COO}]^-$  (72),  $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{bpdc})]^{2-}$  (73). Com base nestes estudos, o método de síntese direta (co-precipitação), foi a abordagem adotada para a intercalação do complexo ALF795 em LDHs. Desta forma, usando uma montagem experimental semelhante à utilizada na síntese do material LDH-Zn,Al, a solução de metais (zinco e alumínio) foi adicionada (gota a gota) à solução aquosa de ALF795, mantendo o pH numa gama de valores entre 7.5-8.0. O sólido rosa pálido foi isolado por filtração e lavado com água e acetona. Este material designado LDH-ALF795 foi caracterizado por várias técnicas como: IV, RMN, difração de Raios-X de pós e análise elementar.

O difratograma de raio-X de pós do material LDH-ALF795, apresentado na **Figura 21**, foi, tal como o do material Zn,Al-NO<sub>3</sub> LDH, coletado à temperatura ambiente numa gama angular de 3 a 70° 2θ.

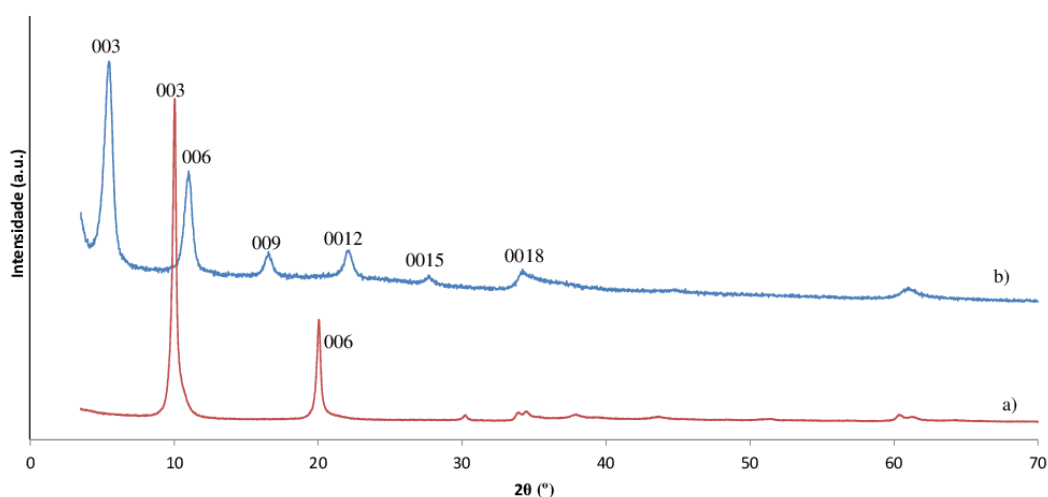
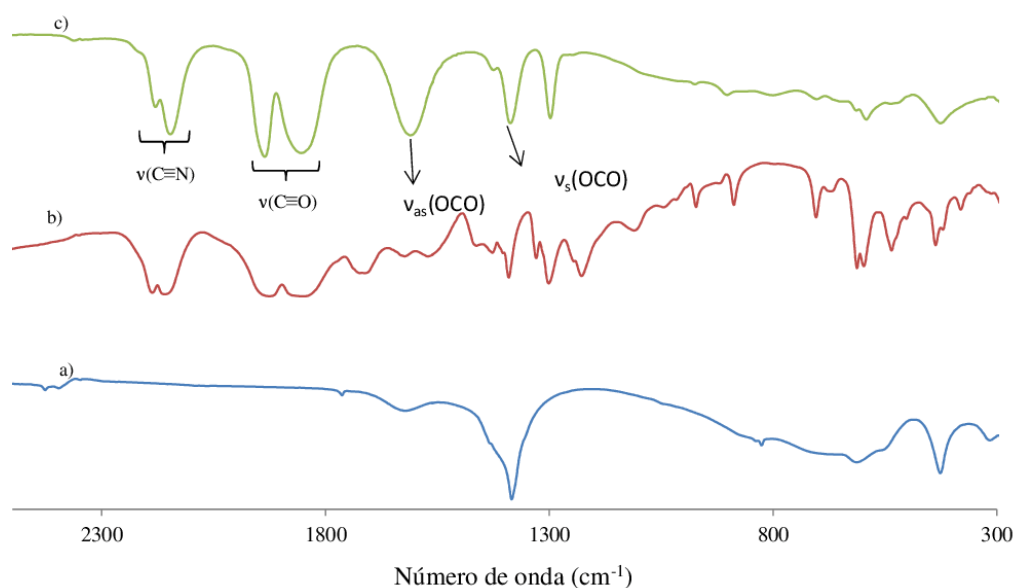


Figura 21: Padrões de Raio-X de pós de (a) LDH-Zn,Al e (b) LDH-ALF795.

Analisando o difratograma obtido podemos inferir que estamos perante hidróxidos duplos lamelares de elevada cristalinidade, uma vez que este apresenta bandas simétricas e igualmente espaçadas a ângulos abaixo de  $30^\circ 2\theta$ , características deste tipo de materiais (113). A análise da reflexão 003 dá-nos a informação acerca da distância interlamelar deste material, que no caso deste composto tem um valor de  $16 \text{ \AA}$ , que é um indicador que a intercalação desejada ocorreu com sucesso já que houve um aumento considerável do espaço interlamelar (76).

Uma análise inicial do espectro de infravermelho, ilustrado na **Figura 22**, permite confirmar o sucesso na intercalação do complexo ALF795 no LDHs.

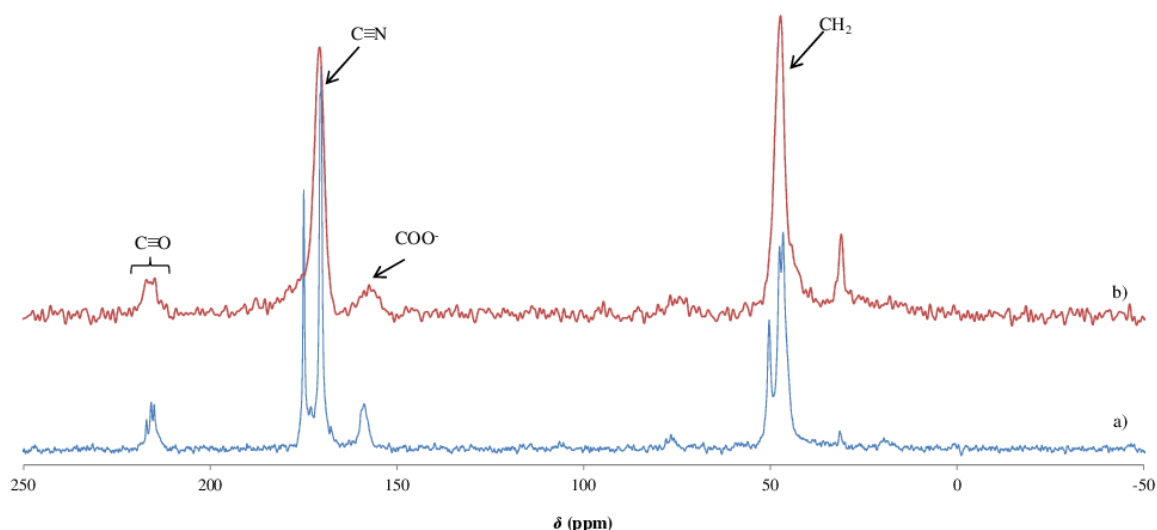


**Figura 22:** Espectro de IV (KBr) de (a) LDH-Zn,Al (b) ALF795 e (c) LDH-ALF795. As bandas selecionadas encontram-se realçadas.

O material LDH-ALF795 apresenta duas bandas fortes a números de onda de  $1934$  e  $1851 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à vibração dos grupos carbonilos, muito semelhantes às bandas que aparecem no espectro de ALF795 o que nos sugere que durante a intercalação não houve perda de grupos carbonilo (61, 73). Tal como o complexo ALF795, o híbrido apresenta duas bandas de forte intensidade a números de onda de  $2184$  e  $2154 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento  $\text{C}\equiv\text{N}$ , que está de acordo com a simetria apresentada inicialmente pelo complexo, pelo que podemos afirmar que após a intercalação, este não sofreu alterações ao nível da sua simetria (73, 110). É ainda possível observar que a banda que surgia a um número de onda de  $1714 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração dos grupos  $-\text{COOH}$  já não se encontra presente neste espectro, no entanto surgem duas novas bandas a números de onda de  $1390$  e  $1612 \text{ cm}^{-1}$  e que podem ser atribuídas às vibrações simétricas e

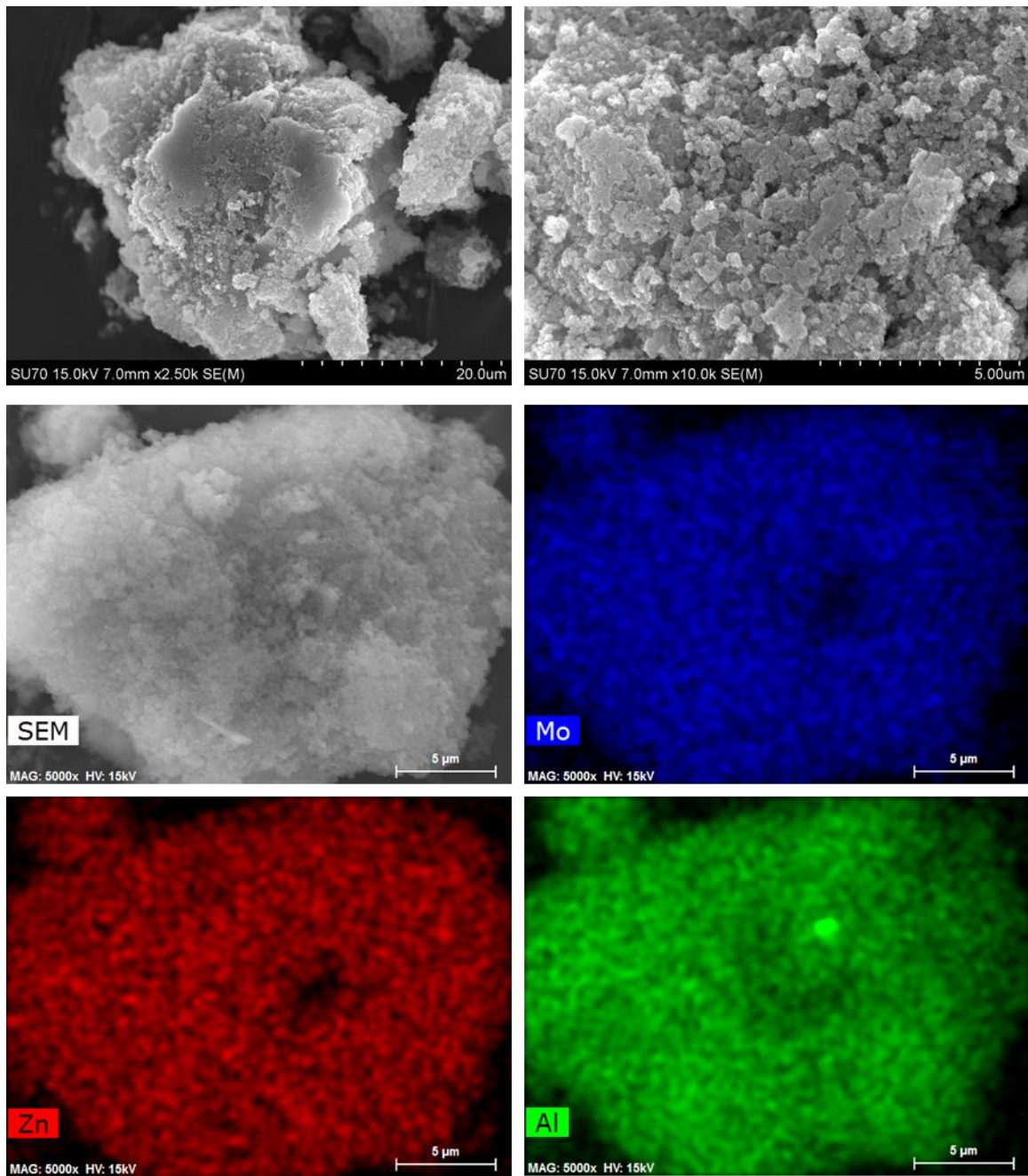
assimétricas ( $\nu_s(\text{OCO})$  e  $\nu_{as}(\text{OCO})$ ), respectivamente, do grupo carboxilato desprotonado (71, 73). Quando comparado o espectro do híbrido com o apresentado pelo material LDH-Zn,Al é possível verificar o desaparecimento da banda correspondente ao estiramento antissimétrico  $\nu_3$  dos iões nitrato, o que nos indica que este material está livre da interferência destes aniões (116).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS do híbrido LDH-ALF795, apresentado na **Figura 23**, exibe três ressonâncias no intervalo 40-175 ppm, correspondentes aos átomos de carbono dos ligandos  $\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , e dois sinais largos sobrepostos a 216.6 e a 217.5 ppm correspondentes aos ligandos carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). Comparando este espectro com o do complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795), verificamos que as ressonâncias do híbrido LDH-ALF795 estão mais alargadas e encontram-se ligeiramente desviados para campo mais alto, provando a integridade do complexo após a intercalação.



**Figura 23:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR de a) ALF795 e b) material LDH-ALF795.

Na **Figura 24** são apresentadas algumas imagens de SEM do material LDH-ALF795 a diferentes ampliações.



**Figura 24: Imagens de SEM de LDH-ALF795. Mapas elementares para os elementos Mo, Zn e Al correspondentes à imagem de SEM legendada com “SEM”.**

O material LDH-ALF795 apresenta partículas com formas irregulares, que quando sujeitas a uma ampliação superior revelam uma forma arredondada. Os perfis elementares espaciais para os elementos Mo, Zn e Al (gerados pela aplicação da técnica de mapeamento elementar) mostram uma distribuição homogênea dos elementos nas partículas.

## 2.4. Análise qualitativa dos perfis de libertação de CO de ALF795 e LDH-ALF795

Para uma análise qualitativa do perfil de libertação de CO do complexo ALF795 e da sua forma intercalada utilizou-se um método desenvolvido por McLean e pela restante equipa (104). Após o tratamento da hemoglobina com ditionito de sódio e a dessalinização desta, adicionou-se o complexo ALF795 à solução de hemoglobina tratada e foi monitorizada ao longo do tempo, através dos espectros de UV/Vis traçados na banda de Soret (próximo dos 400 nm). Os ensaios foram conduzidos a uma temperatura de 37 °C e a um pH de 7.4 de forma a tentar aproximar o máximo possível das condições fisiológicas. Para a análise do perfil de libertação de CO da forma intercalada do ALF795 (LDH-ALF795) procedeu-se de igual forma.

Pela análise dos espectros de UV/Vis, coletados ao longo do tempo, quando adicionado o complexo ALF795, apresentados na **Figura 25**, podemos deduzir que realmente houve libertação de CO.

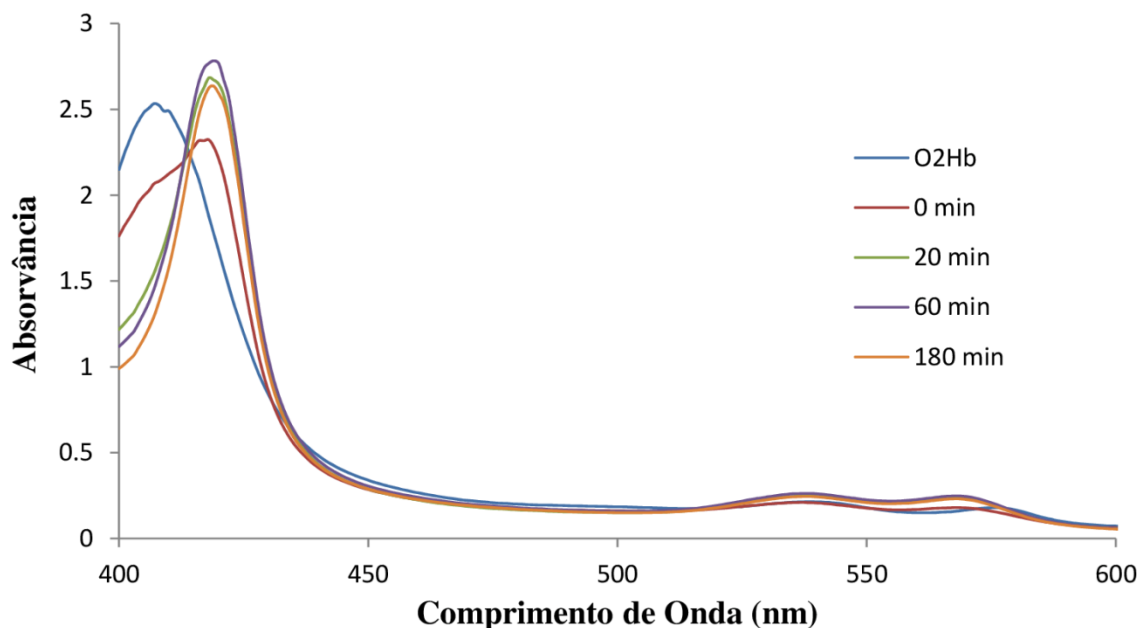
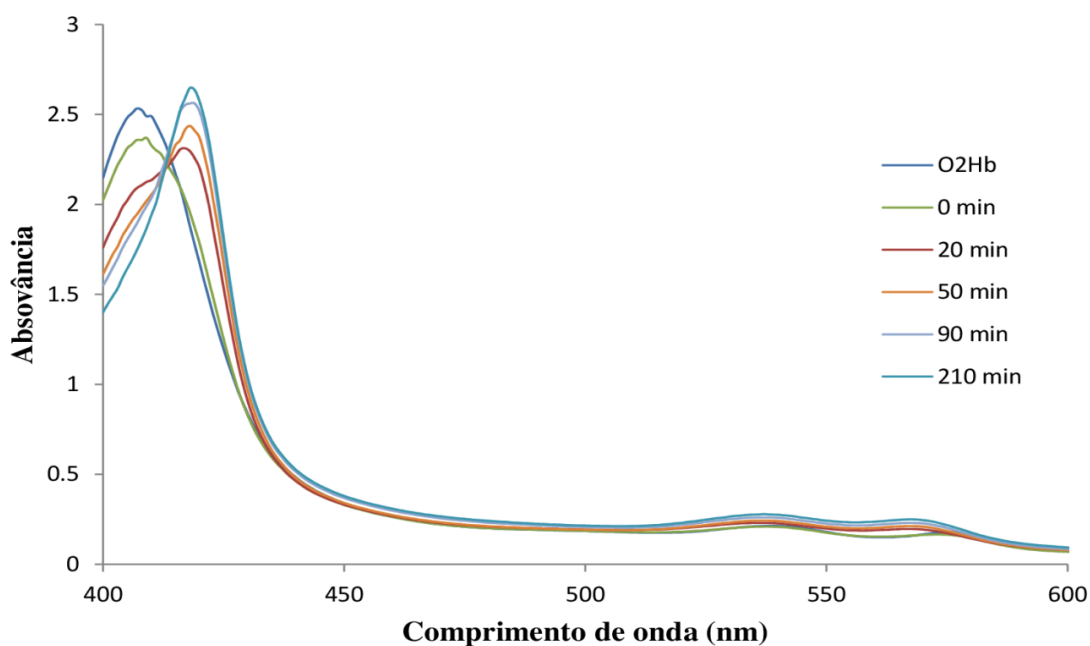


Figura 25: Espectros de UV/Vis da hemoglobina com a adição de ALF795, em tampão KPi a 37 °C, coletados ao longo do tempo. (O<sub>2</sub>-Hb-Oxi-hemoglobina)

A ocorrência de libertação de CO é possível afirmar uma vez que, houve um deslocamento do pico a 405 nm, característico da oxi-hemoglobina, para um comprimento de onda de 420 nm, característico da carboxi-hemoglobina, aos 0 min, ou seja assim que

foi adicionado o complexo ALF795 (104). Este deslocamento ocorre, pois uma vez o CO libertado este ligar-se à hemoglobina, que mesmo estando no estado de oxi-hemoglobina se vai ligar ao CO, devido à sua afinidade para este ser cerca de 200 vezes superior à do oxigénio (5). Podemos ainda afirmar que o complexo em estudo não liberta o CO de uma só vez, mas que o vai sendo libertado ao longo do tempo, visto que a absorvância (diretamente proporcional à concentração de COHb de acordo com a lei de Lambert-Beer) a 420 nm vai aumentando ao longo do tempo. Nos espectros apresentados é ainda possível verificar uma diminuição da absorvância a 420 nm, nomeadamente a 180 min, o que se traduz numa diminuição da concentração de carboxi-hemoglobina na solução. Esta diminuição da concentração de COHb pode ser explicada pela perda de CO para a atmosfera, não se ligando à hemoglobina, uma vez que os testes não foram realizados em uma cuvete selada.

Analisando os espectros de UV/Vis da hemoglobina quando adicionado o material LDH-ALF795, apresentado na **Figura 26**, podemos observar uma evolução nos espectros muito semelhante ao observado quando adicionado o complexo ALF795.



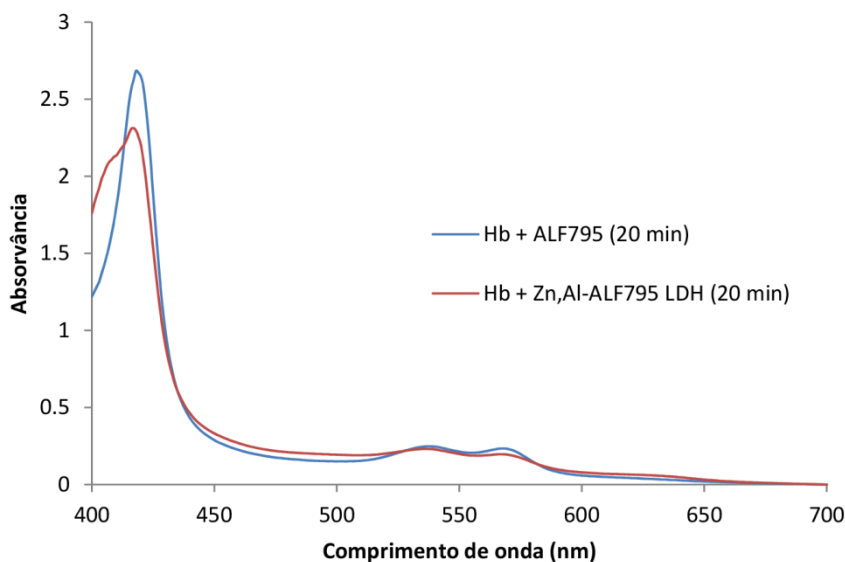
**Figura 26:** Espectros de UV/Vis da hemoglobina com a adição do material Zn,Al-ALF795 LDH, em tampão KPi a 37 °C, coletados ao longo do tempo. (O<sub>2</sub>-Hb-Oxihemoglobina)

No espectro da hemoglobina quando adicionado o material LDH-ALF795 é possível observar, tal como quando é adicionado o complexo ALF795, um deslocamento do pico que surge a um comprimento de onda de 405 nm, característico da oxi-hemoglobina, para



um comprimento de onda de 420 nm, característico da COHb (104). Podemos ainda observar um aumento constante da absorvância a 420 nm, o que de acordo com a lei de Lambert-Beer nos indica um aumento da COHb e por conseguinte um aumento de CO libertado pelo material LDH-ALF795.

Por comparação dos perfis de libertação de CO traçados pelo método descrito e assumindo que caso o complexo interferir de alguma forma no espectro de UV/Vis esta será muito semelhante senão igual à do material LDH-ALF795, podemos dizer que à partida, a libertação de CO no material é mais lenta, visto que o tempo que demora a assumir os mesmos valores de absorvância (diretamente proporcional à concentração de COHb) a um comprimento de onda de 420 nm, é superior ao do complexo ALF795 como demonstra a **Figura 27**.



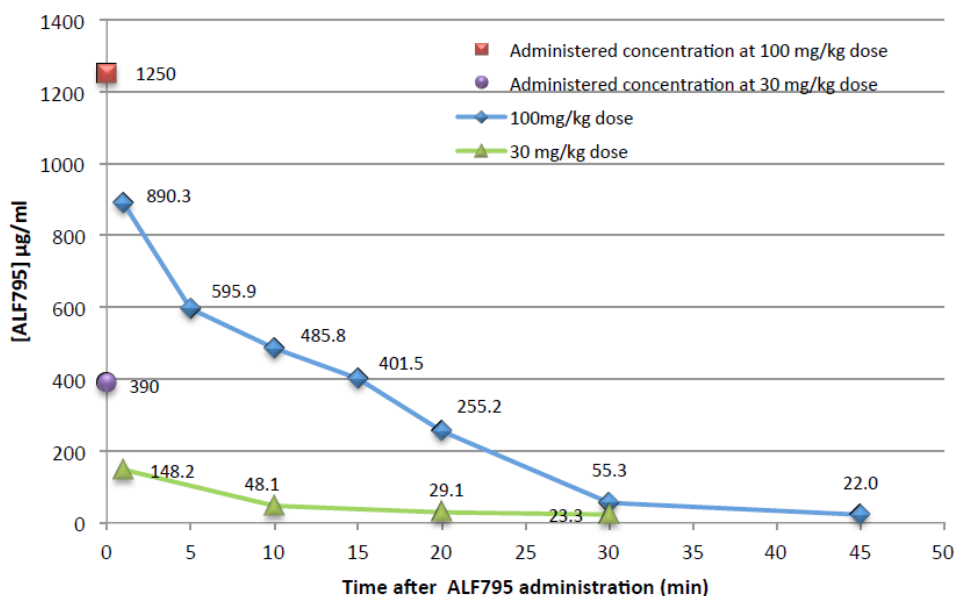
**Figura 27:** Espectros de UV/Vis coletados 20 minutos após a adição do complexo ALF795 e do material LDH-ALF795 à solução de hemoglobina.

Os dados obtidos a partir desta análise são um bom indicador de que o objetivo de tornar a libertação de CO mais lenta com a sua intercalação em hidróxidos duplos lamelares terá sido alcançado. No entanto, esta é apenas uma análise qualitativa, pelo que não é possível retirar conclusões fundamentadas deste tipo de teste, sendo necessário outro tipo de testes para esse efeito.

## 2.5. Quantificação de CO libertado

De forma a quantificar o CO libertado pelo complexo ALF795 e pelo material LDH-ALF795 e da comparação do efeito da temperatura na libertação deste, procedeu-se à adição destes a sangue de ovelha diluído na solução de Alsevers (uma solução salina, rotineiramente utilizada como anticoagulante/conservante do sangue, permitindo o armazenamento de sangue a temperaturas de refrigeração durante aproximadamente 10 semanas) e consequente monitorização do aumento dos níveis de COHb em condições normóxicas, a 37 °C e à temperatura ambiente.

O tempo durante o qual se monitorizaram os valores de COHb foram pré-determinados de acordo com os ensaios de farmacocinética previamente realizados pelo grupo do Prof. Carlos Romão, gentilmente cedidos pelo próprio, e apresentados na **Figura 28**.



**Figura 28:** Farmacocinética do complexo ALF795 quando administrado *in vivo*, cedidos pelo Prof. Carlos Romão.

De acordo com os dados de farmacocinética apresentados, podemos determinar que aproximadamente 45 min após a administração do complexo ALF795 este se encontra praticamente extinto, apresentando uma concentração no sangue (*in vivo*) de apenas 22.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelo que ensaios muito além do tempo de extinção do CORM não terão valor científico. No entanto, com o intuito de comparação da taxa de libertação de CO do

complexo ALF795 e da sua forma intercalada o tempo durante o qual se monitorizam os valores de COHb foram estendidos, passando a ser monitorizados durante 180 min, uma vez que ainda não existem estudos acerca do tempo de extinção do material LDH-ALF795.

Do ensaio à temperatura ambiente com a adição de ALF795 ao sangue de ovelha foram possíveis coletar os dados apresentados na **Tabela 7**, onde são apresentados os valores de hemoglobina total, carboxi-hemoglobina (COHb) e ainda os equivalentes de CO libertados por cada molécula de ALF795 ao longo do tempo. Os valores de COHb apresentados pela amostra com ALF795 são corrigidos com os valores de COHb apresentados pela solução controlo (sangue de ovelha total em solução de Alsevers).

**Tabela 7: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com ALF795 em sangue de ovelha (2.298 mM) à temperatura ambiente.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Hb total (g dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>%O<sub>2</sub>-Hb</b>	<b>%COHb</b>	<b>Equivalentes de CO calculados</b>
<b>0</b>	6.5	97.6	0.0	0.00
<b>15</b>	6.1	95.2	1.3	0.02
<b>30</b>	6.1	92.9	3.9	0.06
<b>60</b>	6.8	89.9	5.9	0.11
<b>120</b>	5.8	83.5	13.6	0.21
<b>180</b>	4.9	77.0	20.3	0.27

Pela análise da **Tabela 7** é possível afirmar que há de facto libertação de CO, uma vez que há um aumento da percentagem de COHb o que significa que o CO foi transferido do complexo ALF795 para a hemoglobina. Podemos ainda deduzir a partir dos dados acima indicados que esta libertação ocorre ao longo do tempo uma vez que há um aumento gradual deste valor. É ainda possível verificar que, findos os 180 min em que são realizadas as medições, apenas 0.27 equivalentes de CO são libertados e transferidos para a hemoglobina, quando, de acordo com a estrutura do complexo em estudo, poderia libertar um máximo de 3 equivalentes, posto isto é possível afirmar que o complexo ALF795 é um CORM de libertação lenta nas condições em que foi realizado este ensaio.

Foi também realizado um ensaio para a quantificação do CO libertado pelo material LDH-ALF795 incubado em sangue de ovelha em solução de Alsevers, ou seja, nas

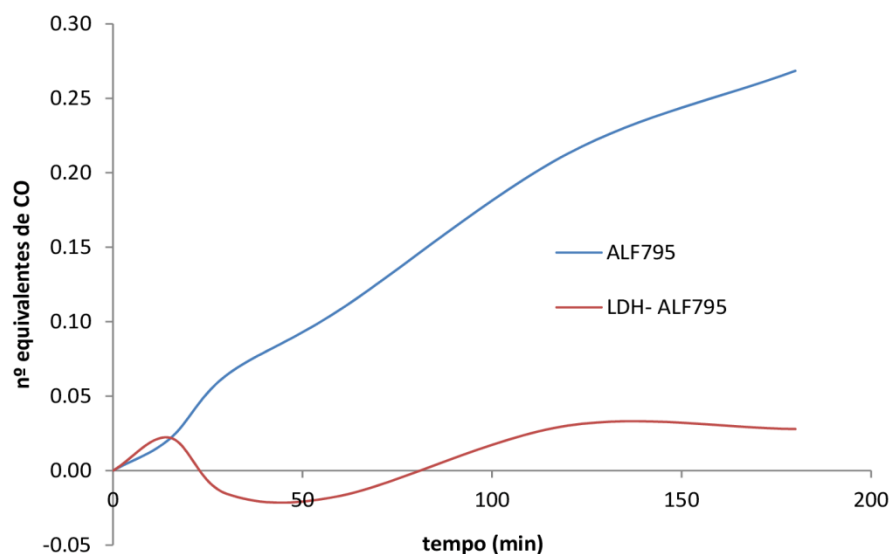
mesmas condição que o ensaio anterior, do qual resultaram os dados apresentados na **Tabela 8**, onde constam os valores de hemoglobina total, carboxi-hemoglobina (COHb) e ainda os equivalentes de CO libertados pelo material LDH-ALF795 ao longo do tempo. Tal como anteriormente os valores de COHb apresentados pela amostra, onde se encontra incubado o material Zn,Al-ALF795 LDH, são corrigidos com os valores de COHb apresentados pela solução controlo (sangue de ovelha total em solução de Alsevers).

**Tabela 8: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com LDH-ALF795 em sangue de ovelha (2.996 mM) à temperatura ambiente.**

Tempo (min)	Hb total (g dL <sup>-1</sup> )	%O <sub>2</sub> -Hb	%COHb	Equivalentes de CO calculados
0	6.0	95.8	0.0	0.00
15	6.3	94.3	1.3	0.02
30	6.4	95.5	0.0	0.00
60	5.7	96.4	0.0	0.00
120	5.6	93.5	2	0.03
150	6.9	90.9	1.5	0.03

Como descrito anteriormente, a análise da **Tabela 8** permite afirmar que houve libertação de CO pelo material LDH-ALF795, traduzido pelo aumento da %COHb, uma vez que o CO libertado é captado pela hemoglobina. Pelo número de equivalentes de CO libertados após 150 min, apenas 0.03 de um total de 3, é possível afirmar que este material apresenta tem uma taxa de libertação de CO muito lenta nas condições em que o ensaio foi realizado. O facto de o valor máximo de %COHb atingido no ensaio ser de apenas %COHb<sub>max</sub>= 2 é um bom indicador da sua possível utilização como CORM, uma vez que não atinge valores potencialmente perigosos para o organismo (8, 9).

Por comparação com o ensaio com o complexo ALF795 podemos afirmar que com a intercalação do complexo ALF795 em hidróxidos duplos lamelares a libertação de CO tornou-se muito mais lenta, como se pode confirmar pelo gráfico apresentado na **Figura 29**.



**Figura 29:** Número de equivalentes de CO libertados ao longo do tempo quando colocado (—) ALF795 ou (—) LDH-ALF795 em sangue de ovelha diluído em solução de Alsevers, à temperatura ambiente.

Desta primeira análise é possível concluir que nas condições experimentais em que o ensaio decorreu, o objetivo de diminuir a taxa de libertação de CO com a intercalação do complexo ALF795, à temperatura ambiente, em hidróxidos duplos lamelares foi alcançado, diminuindo de 0.27 equivalentes para apenas 0.03 equivalentes de CO libertado.

Uma vez confirmado a diminuição da taxa de libertação de CO no sangue com a intercalação em LDHs, foram realizados os mesmos testes, em que se variou apenas a temperatura à qual decorre o ensaio, para tal as amostras foram deixadas a 37 °C de forma a simular a temperatura corporal e verificar se este comportamento se mantém a esta temperatura.

Do ensaio a 37 °C com a incubação de ALF795 em sangue de ovelha foram possíveis coletar os dados apresentados na **Tabela 9**, onde são apresentados os valores de hemoglobina total, carboxi-hemoglobina (COHb) e ainda os equivalentes de CO libertados por molécula de ALF795. Os valores de COHb apresentados pela amostra em análise, onde se encontra incubado o complexo ALF795 são corrigidos com os valores de COHb apresentados pela solução controlo (sangue de ovelha total em solução de Alsevers).

**Tabela 9: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com ALF795 em sangue de ovelha (2.298 mM) a T= 37 °C.**

Tempo (min)	Hb total (g dL <sup>-1</sup> )	%O <sub>2</sub> -Hb	%COHb	Equivalentes de CO calculados
0	6.0	96.3	0.0	0.00
15	5.8	92.5	2.6	0.04
30	5.9	90.2	5.4	0.09
60	6.2	84.7	6.0	0.15
120	6.5	77.0	17.4	0.31
180	6.7	70.0	23.4	0.42

Analisando a **Tabela 9** é possível afirmar que há de facto libertação de CO a uma temperatura de 37 °C, evidenciado pelo aumento da percentagem de COHb e consequentemente do número de equivalentes de CO libertados. Podemos ainda afirmar que esta ocorre ao longo do tempo, o que é evidenciado pelo aumento gradual da COHb e consequentemente de equivalentes de CO libertados para o sangue. Findos os 180 min em que são realizadas as medições, é ainda possível verificar que apenas 0.42 equivalentes de CO são libertados, dos 3 passíveis de serem libertados, dado este facto podemos afirmar que o complexo ALF795 é um CORM de libertação lenta nas condições em que foi realizado este ensaio. Com a comparação do número de equivalentes de CO libertados no ensaio à temperatura ambiente (0.27 equivalentes de CO) e no ensaio a 37 °C (0.42 equivalentes de CO), podemos afirmar que a temperatura tem um efeito positivo no que respeita à libertação de CO do CORM em estudo (ALF795). No entanto, estes valores não se encontram de acordo com os valores obtidos experimentalmente *in vivo* pelo grupo de investigação do Prof. Carlos Romão, apresentados na **Figura 28**, uma vez que *in vivo* o complexo ALF795 apresenta uma degradação muito rápida ( $t_{1/2}$  de aproximadamente 5 minutos) e consequentemente uma taxa de libertação de CO muito rápida, o que nos leva a crer que este complexo terá um comportamento distinto *in vivo*.

Nas mesmas condições (T= 37 °C) foi também realizado um ensaio para a quantificação do CO libertado pelo material LDH-ALF795, do qual resultaram os dados apresentados na **Tabela 10**, onde são apresentados os valores de hemoglobina total, carboxi-hemoglobina (COHb) e ainda os equivalentes de CO libertados por molécula de ALF795. Os valores de COHb apresentados pela amostra em análise, onde se encontra

incubado o material LDH-ALF795 são corrigidos com os valores de COHb apresentados pela solução controlo (sangue de ovelha total em solução de Alsevers).

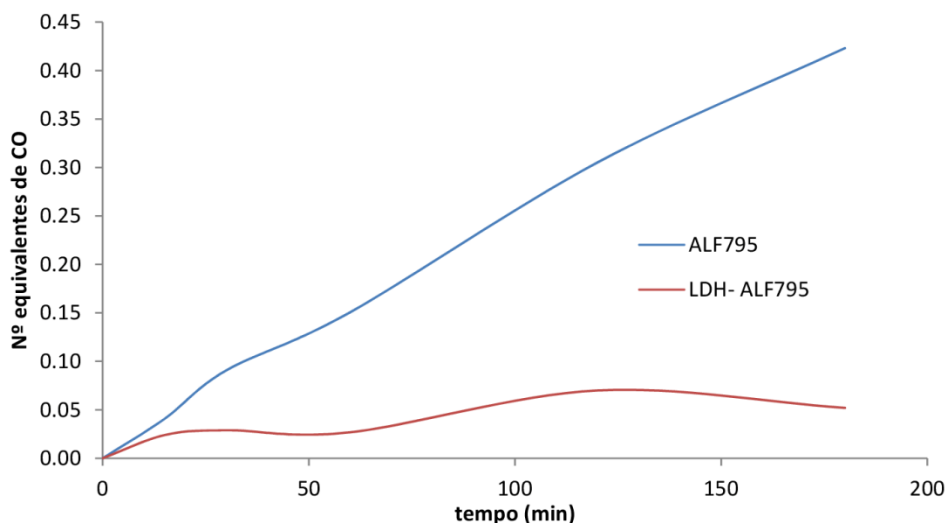
**Tabela 10: Resultados do oxímetro e equivalentes de CO calculados após incubação com LDH-ALF795 em sangue de ovelha (3.341 mM) a T= 37 °C.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Hb total (g dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>%O<sub>2</sub>-Hb</b>	<b>%COHb</b>	<b>Equivalentes de CO calculados</b>
<b>0</b>	6.0	96.3	0	0.00
<b>15</b>	5.9	95.8	1.5	0.02
<b>30</b>	6.3	94.0	1.7	0.03
<b>60</b>	6.2	93.1	1.6	0.03
<b>120</b>	5.4	91.0	4.8	0.07
<b>180</b>	5.5	91.3	3.5	0.05

Tal como nos ensaios apresentados anteriormente, e pela análise da **Tabela 10**, é possível afirmar que houve libertação de CO pelo material LDH-ALF795 a 37 °C. Pelo número de equivalentes de CO libertados após 180 min, apenas 0.05 de um total de 3, é possível afirmar que este tem uma libertação de CO muito lenta nas condições em que o ensaio foi realizado. Uma vez mais, quando comparado o ensaio à temperatura ambiente onde, findos 180 minutos, são libertados apenas 0.03 equivalentes de CO com o ensaio a 37 °C onde se libertam 0.05 equivalentes de CO 180 min após incubação com o material LDH-ALF795 podemos comprovar que a temperatura tem um efeito positivo no que respeita à libertação de CO. Embora o valor máximo de %COHb atingido no ensaio (%COHb<sub>max</sub>= 4.8) seja um pouco superior ao atingido no ensaio à temperatura ambiente (%COHb<sub>max</sub>= 2), este não atinge valores potencialmente perigosos para o organismo, sendo um bom indicador para a possível utilização deste material (LDH-ALF795) como CORM (8, 9).

Finalmente de forma a poder confirmar os resultados obtidos nos ensaios à temperatura ambiente, foram comparados os perfis de libertação de CO do complexo ALF795 e do material LDH-ALF795. Desta comparação é possível confirmar os resultados obtidos anteriormente, ou seja, é possível afirmar que com a intercalação do complexo

ALF795 em hidróxidos duplos lamelares a libertação de CO tornou-se muito mais lenta, como é possível atestar pelo gráfico apresentado na **Figura 30**.



**Figura 30:** Número de equivalentes de CO libertados ao longo do tempo quando colocado (—) ALF795 ou (—) LDH-ALF795 em sangue de ovelha diluído em solução de Alsevers, a  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Desta análise é possível concluir que mesmo quando a temperatura à qual o ensaio é realizado é aumentada para valores semelhantes à temperatura corporal ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), o objetivo de reduzir a taxa de libertação de CO com a intercalação do CORM ALF795 em hidróxidos duplos lamelares foi alcançado, como evidenciado na Figura 20, diminuindo de 0.42 libertados pelo ALF795 para apenas 0.05 equivalentes de CO libertados pelo híbrido LDH-ALF795.

Por comparação do número de equivalentes de CO libertados às diferentes temperaturas às quais os ensaios foram realizados, podemos afirmar que a temperatura tem um efeito positivo nesta libertação tanto ao nível do complexo ALF795 como do híbrido LDH-ALF795. Quando existe um aumento da temperatura ambiente para a temperatura fisiológica ( $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o complexo ALF795 sofre um aumento de 0.15 equivalentes de CO libertados, enquanto no caso do híbrido LDH-ALF795 há um aumento de 0.04 equivalentes de CO libertados.



### **3. Conclusão**

#### **3.1. Observações finais**

Os CORMs são moléculas em desenvolvimento para a libertação de CO no organismo humano, o complexo ALF795 é uma destas moléculas em estudo, no entanto, o facto de este ter um tempo de meia vida no organismo muito curto (cerca de 5 min) o seu estudo foi interrompido. Para a resolução deste e de outro tipo de problemas foram já estudados métodos de encapsulação destes complexos em vários suportes, no entanto todos eles apresentam algumas desvantagens. Estudos recentes acerca do uso dos hidróxidos duplos lamelares como suporte de fármacos apontam algumas vantagens do uso destes materiais, nomeadamente na proteção e libertação controlada do fármaco. No entanto, na literatura não existem registos do uso destes materiais como suportes para CORMs, pelo que decidimos intercalar o complexo ALF795 em LDHs de forma a controlar a libertação de CO por este complexo.

Para tal durante o trabalho experimental apresentado foram sintetizados e caracterizados com sucesso o complexo ALF795, o material LDH-Zn,Al e ainda o híbrido LDH-ALF795, onde a interação entre as lamelas e o complexo organometálico é feito através dos grupos carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) do ligando. O sucesso das sínteses foi confirmado por várias técnicas de caracterização tais como espectroscopia de IV, RMN de sólidos, análise elementar e ainda por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Os estudos acerca da libertação de CO em sangue de ovelha (solução de Alsevers) permitem concluir que nas condições em que o ensaio foi realizado o objetivo de tornar a libertação de CO mais lenta e controlada por parte do complexo ALF795 quando intercalado em hidróxidos duplos lamelares foi atingido.

### 3.2. Trabalho futuro

Uma vez confirmado o sucesso da intercalação do complexo ALF795 em hidróxidos duplos lamelares e o alcance do objetivo inicial do trabalho apresentado, será necessário determinar os próximos passos a seguir para determinar a utilização *in vivo* deste tipo de formulações. Desta forma o próximo passo será proceder à síntese do híbrido LDH-ALF795 de forma a controlar o tamanho das partículas, para que estas possam ser administradas e captadas pelas células e proceder à libertação de CO no interior destas (95).

De acordo com estudos realizados pelo grupo do Professor Carlos Romão sabemos que o complexo ALF795 embora não seja significativamente tóxico quando administrado *in vivo*, no entanto será do interesse da comunidade científica comparar a toxicidade do complexo ALF795 e da sua forma intercalada LDH-ALF795 (61).

Uma vez que os hidróxidos duplos lamelares são matrizes muito sensíveis a meios acídicos, estes não podem ser administrados por via oral, para tal este tipo de híbridos têm de ser protegidos com uma película de polímeros, assim este será também um estudo importante a ser realizado futuramente (95).

## 4. Experimental

### 4.1. Materiais e reagentes

Durante os procedimentos experimentais foram utilizados os seguintes químicos: hexacarbonilo de molibdênio, cicloheptatrieno (Sigma-Aldrich), isocianoacetato de etilo ( $\text{CNCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ , 98%, Sigma-Aldrich), diclorometano (99.8%, Sigma Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH, 2M, Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1M), hexano (Sigma-Aldrich), acetato de etilo (Sigma-Aldrich), tetrahidrofurano (THF), nitrato de zinco hexahidratado ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99%, Fluka), nitrato de alumínio nona-hidratado ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 98.5%, Riedel-de-Haën), hidróxido de sódio (NaOH, 1M, Fluka), acetona, ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ , 82 %, Sigma-Aldrich), hemoglobina (pó liofilizado, Sigma Aldrich) e sangue de ovelha em solução Alsevers (Innovative Research cat no. IR1-020N, Patricell Ltd.) que foram obtidos a partir de fontes comerciais e não sofreram qualquer pré-tratamento. Quando necessário os reagentes para as reações foram desgaseificados e destilados a partir dos agentes de secagem. A preparação de  $(\eta^6\text{-C}_7\text{H}_8)\text{Mo}(\text{CO})_3$  foi realizada de acordo com métodos descritos na literatura (117).

A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação de água Millipore da Synergy, onde a água destilada atravessa duas resinas de troca iônica de modo a retirar todo o material iônico que ainda se encontre na água destilada. No final do processo, a água ultrapura produzida apresenta um valor máximo de 18.2 M $\Omega$  por cm (a 25 °C) de resistividade.

Durante o procedimento experimental foi ainda necessário o uso de uma coluna PD-10 (GE Healthcare), de um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1700 PharmaSpec), tubos de cultura de plástico fechados com tampa (5 mL; 12 × 75 mm), de um oxímetro (AVOXimeter 4000 da A-vox Instruments Inc.) e ainda de cuvetes descartáveis para Avoximeter 4000 da A-vox Instruments Inc.

Quando apropriado, as preparações e manipulações foram realizadas sob uma atmosfera de azoto com o auxílio de uma linha de vácuo, ilustrada na **Figura 31** ou de uma câmara de luvas, ilustrada na **Figura 33**, e da técnica de Schlenk, ilustrado na **Figura 32**. Estes tipos de montagens são utilizados para técnicas livres de oxigênio, ou seja, síntese de compostos sensíveis ao ar e humidade (118, 119).



**Figura 32: Linha de vácuo.**



**Figura 31: Tubo de Schlenk**



**Figura 33: Câmara de luvas.**

A linha de vácuo usada tem duas posições, uma em que cria um ambiente de vácuo e uma outra que liberta o gás inerte (neste caso particular o azoto), tudo isto é possível porque as torneiras apresentam duas posições que permitem escolher a atmosfera desejada.

#### 4.2. Métodos de caracterização

Os compostos obtidos foram caracterizados por diversas técnicas. As análises elementares para C, H e N foram obtidas no Truspec e pela técnica Manuela Marques. Os difratogramas de Raios-X de pós foram recolhidos à temperatura ambiente, obtidos num difractor Philips Analytical Empyrean ( $\theta/2\theta$ ), utilizando radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ ), na Universidade de Aveiro, analisando uma gama angular de  $3.5$  a  $70^\circ 2\theta$ , o tempo por passo foi cerca de  $50 \text{ s}$  e com um passo de  $0.02^\circ 2\theta$ . As análises de SEM com EDS acoplado foram realizadas no Hitachi SU-70 com uma voltagem de aceleração de  $15 \text{ kV}$ . As amostras foram preparadas por deposição em um porta-amostras de alumínio seguida por revestimento de carbono, utilizando um evaporador de carbono Emitech K 950. As análises de EDS foram realizadas no mesmo aparelho equipado com um espectrofotómetro Bruker Quantax 400. Os espectros de IV foram obtidos com pastilhas de KBr, utilizando um espectrofotómetro FTIR Mattson-7000 numa gama de comprimentos de onda de  $4000$  a  $350 \text{ cm}^{-1}$ , com  $128$  scans e uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros de estado sólido de  $^{13}\text{C}$  CP MAS foram obtidos a  $100.62 \text{ MHz}$  com um pulso de  $3.3 \text{ \mu s}$ ,  $2 \text{ ms}$  de tempo de contacto frequência de rotação de  $14 \text{ kHz}$  e um tempo de intervalo de  $4 \text{ s}$  entre cada ciclo. Os desvios químicos são referidos em partes por milhão (ppm) em relação sinal de tetrametilsilano (TMS).

#### 4.3. Síntese do complexo $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$ (ALF795)

O complexo  $\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$  (ALF795) foi sintetizado de acordo com o procedimento geral descrito por Romão e os seus colaboradores (61).

O composto previamente preparado  $(\eta^6\text{-C}_7\text{H}_8)\text{Mo}(\text{CO})_3$  ( $1.20 \text{ g}$ ,  $4.41 \text{ mmol}$ ) foi dissolvido em THF anidro e foram adicionados, gota a gota, 3 equivalentes de  $\text{CNCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  ( $1.52 \text{ mL}$ ,  $13.23 \text{ mmol}$ ). A solução vermelha torna-se laranja e de

seguida laranja claro em ca. de 50-60 min. De seguida foi evaporado o solvente e o óleo obtido foi redissolvido em diclorometano e colocado numa coluna de sílica, equilibrado em hexano. O produto foi eluído com hexano/ acetato de etilo (6:4). As análises com TLC mostraram que a primeira mancha era insignificante e que o produto principal era a segunda mancha. As frações correspondentes foram recolhidas e levadas à secura, gerando a forma éster (2.0 g,  $\eta$ = 87%).

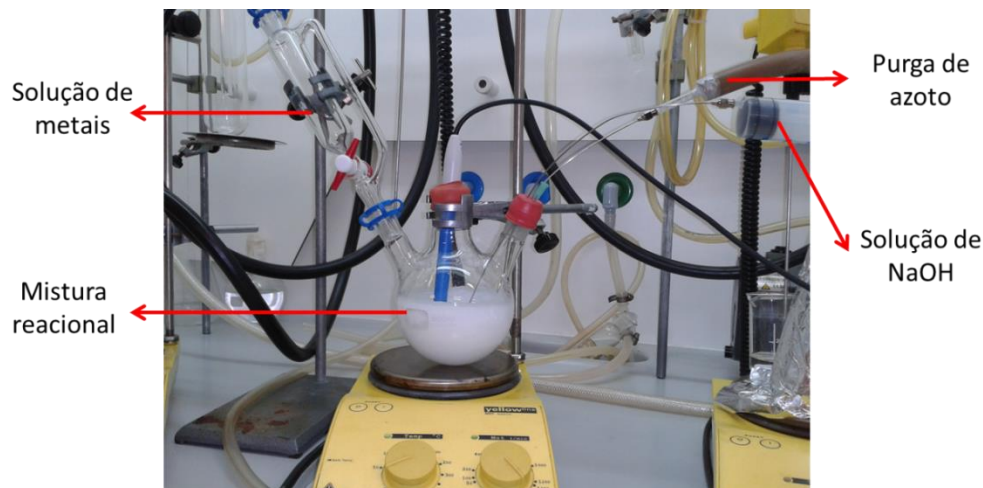
Uma solução aquosa de 10 equivalentes de NaOH (18.3 mL, 36.56 mmol) foi adicionada gota a gota a uma solução de THF (20 mL) do composto (1.90 g, 3.66 mmol) foi em banho de gelo. A solução tornou-se amarela escura e foi deixada a reagir durante 1 h enquanto aquecia lentamente até à temperatura ambiente. De seguida a solução foi filtrada e o solvente foi removido por vácuo. Após isto, foram adicionados 5 mL de água e 3 equivalentes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (11.0 mL, 10.98 mmol) gota a gota, formando um precipitado esbranquiçado. A solução neutra tornou-se ácida (pH= 3), o sólido foi filtrado, lavado com água (2 x 10 mL) e seco sob vácuo durante 3 horas. (1.00 g,  $\eta$ = 63 %) Anal. Calcd. para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>MoO<sub>9</sub> (435.15): C, 33.12; H, 2.09; N, 9.66. Encontrada: C, 27.94; H, 2.30; N, 8.08. FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu$  = 3442 (br), 2964 (w), 2931 (w), 2772 (sh), 2611 (w), 2535 (w), 2184 (vs,  $\nu$ (C≡N)), 2154 (vs,  $\nu$ (C≡N)), 1926 (vs,  $\nu$ (CO)), 1853 (vs,  $\nu$ (CO)), 1714 (f), 1624 (m), 1564 (m), 1458 (sh), 1427 (m), 1390 (f), 1326 (m), 1295 (f,  $\nu$ (C–O)), 1238 (sh,  $\nu$ (C–O)), 1220 (f,  $\nu$ (C–O)), 1106 (m), 1041 (w), 1014 (sh), 971 (s), 917 (sh), 887 (f), 706 (f), 667 (w), 611 (vs), 596 (vs), 534 (f), 436 (f), 380 (m). <sup>13</sup>C CP MAS NMR:  $\delta$  = 217.2, 215.9, 214.9 (C≡O), 172.6, 170.1 (C≡N), 158.9 (COOH), 50.3, 47.5, 45.2 (CNCH<sub>2</sub>).

#### 4.4. Síntese de LDH-Zn,Al

Para a realização da síntese foi necessário a descarbonatação de uma grande quantidade de água ultra-pura, pelo que se iniciaram os trabalhos colocando a água a uma temperatura superior a 100 °C, e deixando ferver durante 20 min.

De seguida foi preparada a solução de metais, com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (9.82 g, 33.01mmol) e Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (6.18 g, 16.47 mmol) dissolvidos na água (100 mL) previamente descarbonatada. A solução foi rapidamente transferida para a ampola de adição e colocada sob atmosfera de azoto.

De seguida, foi preparada uma solução de 100 mL de NaOH 1M, que foi colocada no schlenk onde foi efetuada a purga azoto. Uma pequena quantidade da água (100 mL) descarbonatada inicialmente foi adicionada ao balão de fundo redondo de três tubuladuras e colocada sob uma atmosfera de azoto. A montagem experimental encontra-se representada na **Figura 34**.



**Figura 34: Montagem experimental para a síntese de LDH-Zn,Al.**

Finalizada a montagem experimental ilustrada na **Figura 34**, procedeu-se à adição simultânea da solução de metais (gota a gota) com a solução de NaOH controlando o pH da mistura reacional para que este se mantenha entre 7.5 e 8.0, resultando em um pH final de 7.6.

A suspensão obtida foi deixada a envelhecer durante aproximadamente 20 h a uma temperatura de 85 °C, após este período o pH da solução manteve-se constante.

O sólido branco obtido foi isolado por filtração e lavado exaustivamente com água ultra pura, resultando numa massa de 0.46 g. Anal. calcd para  $Zn_3Al_2(OH)_{10}(NO_3)_{1.9}(CO_3)_{0.05} \cdot 3.5(H_2O)$  (604.07): C, 0.10; H, 2.84; N, 4.41 Found: C, 0.23; H, 2.86; N, 4.43%. FT-IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu = 3446$  (br), 1762 (w), 1621 (m), 1384 (vs), 825 (w), 613 (m), 426 (f), 316 (w).

#### 4.5. Síntese do material LDH-ALF795

Inicialmente foi preparada a solução de metais com  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.60 g, 2.02 mmol) e  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0.38 g, 1.01 mmol) dissolvidos em água ultrapura (30 mL) previamente descarbonatada. Esta solução foi rapidamente transferida para a ampola de adição e colocada sob uma atmosfera de azoto.

De seguida, foi preparada uma solução de 100 mL de NaOH 0.2 M, que foi colocada no schlenk e deixada a ser purgada com azoto. No balão de fundo redondo foi preparada uma solução do sal de sódio  $[\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CNCH}_2\text{COO})_3]\text{Na}_3$  adicionando 3 equivalentes de NaOH a uma suspensão aquosa (30 mL) de ALF795 (0.22 g, 0.50 mmol). Procedeu-se à adição da solução de metais (gota a gota) à solução contendo o ALF795, controlando o pH da mistura reacional com a solução de NaOH de forma a que se mantenha entre 7.5 e 8.0, resultando em um pH final de 7.7.

A suspensão obtida foi deixada a envelhecer durante aproximadamente 19 h a uma temperatura de 65 °C, após este período o pH da solução manteve-se constante.

O sólido obtido foi isolado por filtração e lavado exaustivamente com água ultra pura e acetona, e finalmente seca sob vácuo resultando numa massa de 0.54 g. Anal. Calc. para  $\text{Zn}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}(\text{MoC}_{12}\text{O}_9\text{N}_3\text{H}_6)_{0.66} \cdot 3.5(\text{H}_2\text{O})$  (867.87): C, 10.96; H, 2.66; N, 3.20. Anal. encontrada: C, 7.04; H, 2.47; N, 2.16. FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu = 3415$  (br), 2985 (sh), 2933 (sh), 2183 (f,  $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ ), 2150 (vs,  $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ ), 1934 (vs,  $\nu(\text{CO})$ ), 1851 (vs,  $\nu(\text{CO})$ ), 1612 (f,  $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ ), 1429 (w), 1390 (f,  $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ ), 1298 (f), 1238 (sh), 971 (w), 906 (w), 809 (w), 704 (w), 617 (sh), 595 (m), 534 (sh), 428 (m).  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR:  $\delta = 216.6, 217.5$  ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ), 170.9 ( $\text{C}\equiv\text{NCH}_2$ ), 157.6 ( $\text{COO}$ ), 47.4 ( $\text{C}\equiv\text{NCH}_2$ ).

#### 4.6. Análise de libertação de CO por UV/Vis

As análises de libertação de CO por UV/Vis foram realizados no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) no grupo do Professor Carlos Romão.

Para uma análise qualitativa dos perfis de libertação de CO do complexo ALF795 e do material LDH-ALF795 começou-se por preparar uma solução de hemoglobina bovina (0.0385 g, 199  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato (KPi) 0.1 M com um pH 7.4, previamente preparado no laboratório. A solução da proteína anteriormente preparada foi tratada com



solução de ditionito de sódio (0.0173 g, 0.099 M), utilizando 15 µL desta solução por cada mililitro da solução de hemoglobina e deixada a reagir durante a noite. No dia seguinte a solução foi dessalinizada numa coluna PD-10 de forma a que o agente redutor (ditionito de sódio) não tivesse qualquer efeito na libertação de CO. De acordo com as indicações fornecidas pelo fabricante da coluna, sabe-se que a solução carregada é diluída aproximadamente duas vezes, pelo que a concentração da solução de hemoglobina dessalinizada terá uma concentração de cerca de 100 µM. Desta forma, para atingir a concentração desejada para a solução *stock* (aproximadamente 20 µM), diluiu-se esta solução ca. de 8 vezes. As preparações anteriores foram realizadas em anóxia, recorrendo ao uso de uma câmara de luvas.

De seguida, preparou-se a solução a analisar, onde se adicionaram 200 µL da solução *stock* de hemoglobina a 800 µL do tampão KPi, utilizado anteriormente, e colocaram-se num banho de 37 °C durante 15 min. Findo o tempo determinado adicionou-se o complexo ALF795 à solução, agitou-se e determinou-se de imediato o espetro da solução. Mantendo a solução a 37 °C e com agitação, foram traçados ao longo do tempo os espetros da hemoglobina. Para a análise do perfil de libertação de CO do híbrido LDH-ALF795 repetiu-se o processo descrito anteriormente.

#### **4.7. Quantificação de CO libertado por medição da elevação de COHb**

As análises de quantificação de CO libertado foram realizadas no grupo do Professor Carlos Romão, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB).

No início do trabalho experimental foram colocados 4 mL de sangue de ovelha em solução de Alservers (solução salina, rotineiramente utilizada como anticoagulante/conservante do sangue, permitindo o armazenamento de sangue a temperaturas de refrigeração durante aproximadamente 10 semanas) num banho de 37 °C durante 15 min. Findo o tempo de espera foi transferido 1 mL para cada um de 2 tubos de cultura de plástico fechados com tampa, previamente selados com papel de alumínio para evitar um possível efeito da luz na libertação de CO. A amostra de sangue de ovelha em solução Alservers em que nenhum composto é adicionado, foi utilizada como controlo negativo durante o procedimento experimental. Ao segundo tubo de plástico adicionou-se

o complexo ALF795 (0.0010 g, 2.298 mM) e, retirando uma alíquota, e efetuaram-se de imediato as medições utilizando o oxímetro, como o representado na **Figura 35**, de forma a seguir o aumento da percentagem de COHb.



**Figura 35:** Ilustração do oxímetro utilizado (AVOXimeter 4000 da A-vox Instruments Inc.).

Para a quantificação da libertação de CO pelo material LDH-ALF795 repetiu-se o processo anterior, apenas substituindo o complexo ALF795 pelo híbrido LDH-ALF795 (0.0029 g, 3.341 mM). Durante todo o processo experimental as amostras a analisar foram mantidas num banho a 37 °C.

Com o intuito de comparação do efeito da temperatura foram ainda realizados os mesmos testes com ALF795 (0.0010 g, 2.298 mM) e LDH-ALF795 (0.0026 g, 2.996 mM) à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e segundo o procedimento experimental descrito. A quantidade de CO libertado foi calculada com base na quantidade de composto adicionado inicialmente, a quantidade total de hemoglobina e a percentagem de COHb (ambos fornecidos pelo oxímetro).

## 5. Bibliografia

1. Haldane J. B. S. Carbon monoxide as a tissue poison. *Biochem J.* 1927;21(5):1068-1075.
2. Wu L. Y., Wang R. Carbon monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):585-630.
3. Prockop L. D., Chichkova R. I. Carbon monoxide intoxication: An updated review. *J Neurol Sci.* 2007;262(1-2):122-130.
4. Gorman D., Drewry A., Huang Y. L., Sames C. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology.* 2003;187(1):25-38.
5. Rodkey F. L., Oneal J. D., Collison H. A., Uddin D. E. Relative Affinity of Hemoglobin-S and Hemoglobin-a for Carbon-Monoxide and Oxygen. *Clin Chem.* 1974;20(1):83-84.
6. Varon J., Marik P. E., Fromm R. E., Gueler A. Carbon monoxide poisoning: A review for clinicians. *J Emerg Med.* 1999;17(1):87-93.
7. Roughton F. J. W., Darling R. C. The effect of carbon monoxide on the oxyhemoglobin dissociation curve. *Am J Physiol.* 1944;141(1):17-31.
8. Omaye S. T. Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. *Toxicology.* 2002;180(2):139-150.
9. Otterbein L. E. The Evolution of Carbon Monoxide Into Medicine. *Resp Care.* 2009;54(7):925-932.
10. Sjöstrand T. Endogenous Formation of Carbon Monoxide in Man under Normal and Pathological Conditions. *Scand J Clin Lab Inv.* 1949;1(3):201-214.
11. Scharte M., Bone H. G., Van Aken H., Meyer J. Increased carbon monoxide in exhaled air of critically ill patients. *Biochem Bioph Res Co.* 2000;267(1):423-426.
12. Sjöstrand T. The Formation of Carbon Monoxide by the Decomposition of Haemoglobin *In vivo*. *Acta Physiol Scand.* 1952;26(4):338-344.
13. Coburn R. F., Forster R. E., Blakemore W. S. Endogenous Carbon Monoxide Production in Man. *J Clin Invest.* 1963;42(7):1172-1178.
14. Coburn R. F., Williams W. J., Kahn S. B. Endogenous Carbon Monoxide Production in Patients with Hemolytic Anemia. *J Clin Invest.* 1966;45(4):460-468.

15. Tenhunen R., Marver H. S., Schmid R. Enzymatic Conversion of Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase. *P Natl Acad Sci USA*. 1968;61(2):748-755.
16. Zobi F. CO and CO-releasing molecules in medicinal chemistry. *Future Med Chem*. 2013;5(2):175-188.
17. Sei-ichiro Tsuchihashi, Ronald W. Busuttil, Kupiec-Weglinski Jerzy W. Heme Oxygenase System. In: Dufour J-F, Clavien P-A, Trautwein C, Graf R, editors. *Signaling Pathways in Liver Diseases*: Berlin Heidelberg; 2005. p. 291-298.
18. Johnson T. R., Mann B. E., Clark J. E., Foresti R., Green C. J., Motterlini R. Metal carbonyls: A new class of pharmaceuticals. *Angew Chem Int Edit*. 2003;42(32):3722-3729.
19. Coburn R. F. Carbon Monoxide Body Stores. *Ann Ny Acad Sci*. 1970;174(1):11-22.
20. Young L. J., Caughey W. S. Mitochondrial Oxygenation of Carbon-Monoxide. *Biochem J*. 1986;239(1):225-227.
21. Durante W., Johnson F. K., Johnson R. A. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):672-686.
22. Kim H. P., Ryter S. W., Choi A. M. K. CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2006;46:411-449.
23. Motterlini R., Otterbein L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(9):728-743.
24. Utz J., Ullrich V. Carbon-Monoxide Relaxes Ileal Smooth-Muscle through Activation of Guanylate-Cyclase. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(8):1195-1201.
25. Ramos K. S., Lin H., Mcgrath J. J. Modulation of Cyclic Guanosine-Monophosphate Levels in Cultured Aortic Smooth-Muscle Cells by Carbon-Monoxide. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(8):1368-1370.
26. Snyder S. H., Jaffrey S. R., Zakhary R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Rev*. 1998;26(2-3):167-175.
27. Brune B., Ullrich V. Inhibition of Platelet-Aggregation by Carbon-Monoxide Is Mediated by Activation of Guanylate-Cyclase. *Mol Pharmacol*. 1987;32(4):497-504.
28. Morita T., Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2676-2682.

29. Günther L., Berberat P. O., Haga M., Brouard S., Smith R. N., Soares M. P., Bach F. H., Tobiasch E. Carbon monoxide protects pancreatic  $\beta$ -cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation. *Diabetes*. 2002;51(4):994-999.
30. Cardell L. O., Ueki I. F., Stjarne P., Agusti C., Takeyama K., Linden A., Nadel J. A. Bronchodilatation *in vivo* by carbon monoxide, a cyclic GMP related messenger. *Brit J Pharmacol*. 1998;124(6):1065-1068.
31. Kyriakis J. M., Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*. 1996;18(7):567-577.
32. Liu H. J., Mount D. B., Nasjletti A., Wang W. H. Carbon monoxide stimulates the apical 70-pS  $K^+$  channel of the rat thick ascending limb. *J Clin Invest*. 1999;103(7):963-970.
33. Wang R., Wu L. Y. The chemical modification of K-Ca channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1997;272(13):8222-8226.
34. Liu Y. C., Wu S. N. BAY 41-2272, a potent activator of soluble guanylyl cyclase, stimulates calcium elevation and calcium-activated potassium current in pituitary GH(3) cells. *Clin Exp Pharmacol P*. 2005;32(12):1078-1087.
35. Motterlini R., Otterbein L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(9):728-724.
36. Romão C. C., Blattler W. A., Seixas J. D., Bernardes G. J. L. Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chem Soc Rev*. 2012;41(9):3571-3583.
37. Motterlini R., Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B. E., Green C. J. Carbon monoxide-releasing molecules - Characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res*. 2002;90(2):17-24.
38. Use of co-releasing compounds for the manufacture of a medicament for the treatment of inflammatory diseases. Haas W., Romão C., Royo B., Fernandes A.C., Gonçalves I., Alfama- Invesrigação e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos Lda.2003. WO2003/066067.
39. Heinemann S. H., Hoshi T., Westerhausen M., Schiller A. Carbon monoxide - physiology, detection and controlled release. *Chem Commun*. 2014;50(28):3644-3660.
40. Romanski S., Kraus B., Guttentag M., Schlundt W., Rucker H., Adler A., Neudorfl J. M., Alberto R., Amslinger S., Schmalz H. G. Acyloxybutadiene tricarbonyl iron

complexes as enzyme-triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs): a structure-activity relationship study. *Dalton T.* 2012;41(45):13862-13875.

41. Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochem Soc T.* 2007;35:1142-1146.

42. Mann B. E. CO-Releasing Molecules: A Personal View. *Organometallics.* 2012;31(16):5728-5735.

43. Foresti R., Hammad J., Clark J. E., Johnson T. R., Mann B. E., Friebe A., Green C. J., Motterlini R. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Brit J Pharmacol.* 2004;142(3):453-460.

44. Motterlini R., Sawle P., Bains S., Hammad J., Alberto R., Foresti R., Green C. J. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *Faseb J.* 2004;18(14):284-286.

45. Zimmermann A., Leffler C. W., Tcheranova D., Fedinec A. L., Parfenova H. Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule CORM-A1 against seizure-induced neonatal vascular injury. *Am J Physiol-Heart C.* 2007;293(4):2501-2507.

46. Rattan S., Haj R. A., De Godoy M. A. F. Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol-Gastr L.* 2004;287(3):605-611.

47. Megias J., Busserolles J., Alcaraz M. J. The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. *Brit J Pharmacol.* 2007;150(8):977-986.

48. Qin W. T., Zhang J. L., Lv W. H., Wang X., Sun B. W. Effect of Carbon Monoxide-Releasing Molecules II-liberated CO on Suppressing Inflammatory Response in Sepsis by Interfering with Nuclear Factor Kappa B Activation. *Plos One.* 2013;8(10).

49. Musameh M. D., Fuller B. J., Mann B. E., Green C. J., Motterlini R. Positive inotropic effects of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in the isolated perfused rat heart. *Brit J Pharmacol.* 2006;149(8):1104-1112.

50. Sawle P., Hammad J., Fairlamb I. J. S., Moulton B., O'Brien C. T., Lynam J. M., Duhme-Klair A. K., Foresti R., Motterlini R. Bioactive properties of iron-containing carbon monoxide-releasing molecules. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):403-410.

51. Permyakov E. *Metalloproteomics*: Wiley; 2009.

52. Mendel R. R. Cell biology of molybdenum. *Biofactors.* 2009;35(5):429-434.

53. Mendel R. R. Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton T.* 2005(21):3404-3409.
54. Zhang W. Q., Whitwood A. C., Fairlamb I. J. S., Lynam J. M. Group 6 Carbon Monoxide-Releasing Metal Complexes with Biologically-Compatible Leaving Groups. *Inorg Chem.* 2010;49(19):8941-8952.
55. Fairlamb I. J. S., Lynam J. M., Moulton B. E., Taylor I. E., Duhme-Klair A. K., Sawle P., Motterlini R.  $\eta^1$ -2-pyrone metal carbonyl complexes as CO-releasing molecules (CO-RMs): A delicate balance between stability and CO liberation. *Dalton T.* 2007(33):3603-3605.
56. Zhang W. Q., Atkin A. J., Thatcher R. J., Whitwood A. C., Fairlamb I. J. S., Lynam J. M. Diversity and design of metal-based carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in aqueous systems: revealing the essential trends. *Dalton T.* 2009(22):4351-4358.
57. Nobre L. S., Seixas J. D., Romão C. C., Saraiva L. M. Antimicrobial action of carbon monoxide-releasing compounds. *Antimicrob Agents Ch.* 2007;51(12):4303-4307.
58. Wang P. P., Liu H. P., Zhao Q. Y., Chen Y. L., Liu B., Zhang B. P., Zheng Q. Syntheses and evaluation of drug-like properties of CO-releasing molecules containing ruthenium and group 6 metal. *Eur J Med Chem.* 2014;74:199-215.
59. Seixas J. D., Mukhopadhyay A., Santos-Silva T., Otterbein L. E., Gallo D. J., Rodrigues S. S., Guerreiro B. H., Gonçalves A. M. L., Penacho N., Marques A. R., Coelho A. C., Reis P. M., Romão M. J., Romão C. C. Characterization of a versatile organometallic pro-drug (CORM) for experimental CO based therapeutics. *Dalton T.* 2013;42(17):5985-5998.
60. Schallner N., Romão C. C., Biermann J., Lagrèze W. A., Otterbein L. E., Buerkle H., Loop T., Goebel U. Carbon Monoxide Abrogates Ischemic Insult to Neuronal Cells via the Soluble Guanylate Cyclase-cGMP Pathway. *Plos One.* 2013;8(4).
61. Marques A. R., Kromer L., Gallo D. J., Penacho N., Rodrigues S. S., Seixas J. D., Bernardes G. J. L., Reis P. M., Otterbein S. L., Ruggieri R. A., Gonçalves A. S. G., Gonçalves A. M. L., De Matos M. N., Bento I., Otterbein L. E., Blattler W. A., Romão C. C. Generation of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CO-RMs) as Drug Candidates for the Treatment of Acute Liver Injury: Targeting of CO-RMs to the Liver. *Organometallics.* 2012;31(16):5810-5822.

62. Kromer L., Coelho A. C., Bento I., Marques A. R., Romão C. C. The effect of specific modifications of the amine ligands on the solubility, stability, CO release to myoglobin and whole blood, cell toxicity and haemolytic index of  $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{NR}_3)_2]$  complexes. *J Organomet Chem.* 2014;760:89-100.
63. Haas W., Romão C.C., Rodrigues S.S., Seixas J.D., Pina A.R.M. Molybdenum carbonyl complexes for treating rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Google Patents; 2007.
64. Garcia-Gallego S., Bernardes G. J. L. Carbon-Monoxide-Releasing Molecules for the Delivery of Therapeutic CO In Vivo. *Angew Chem Int Edit.* 2014;53(37):9712-9721.
65. Hasegawa U., van der Vlies A. J., Simeoni E., Wandrey C., Hubbell J. A. Carbon Monoxide-Releasing Micelles for Immunotherapy. *J Am Chem Soc.* 2010;132(51):18273-18280.
66. Brückmann N. E., Wahl M., Reiss G. J., Kohns M., Wätjen W., Kunz P. C. Polymer Conjugates of Photoinducible CO-Releasing Molecules. *Eur J Inorg Chem.* 2011(29):4571-4577.
67. Dordelmann G., Meinhardt T., Sowik T., Krueger A., Schatzschneider U. CuAAC click functionalization of azide-modified nanodiamond with a photoactivatable CO-releasing molecule (PhotoCORM) based on  $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]^+$ . *Chem Commun.* 2012;48(94):11528-11530.
68. Govender P., Pai S., Schatzschneider U., Smith G. S. Next Generation PhotoCORMs: Polynuclear Tricarbonylmanganese(I)-Functionalized Polypyridyl Metallodendrimers. *Inorg Chem.* 2013;52(9):5470-5478.
69. Matson J. B., Webber M. J., Tamboli V. K., Weber B., Stupp S. I. A peptide-based material for therapeutic carbon monoxide delivery. *Soft Matter.* 2012;8(25):6689-6692.
70. Balula S. S., Coelho A. C., Braga S. S., Hazell A., Valente A. A., Pillinger M., Seixas J. D., Romão C. C., Gonçalves I. S. Influence of cyclodextrins on catalytic olefin epoxidation with metal-carbonyl compounds. Crystal structure of the TRIMEB complex with  $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{Cl}$ . *Organometallics.* 2007;26(27):6857-6863.
71. Gomes A. C., Bruno S. M., Gamelas C. A., Valente A. A., Abrantes M., Gonçalves I. S., Romão C. C., Pillinger M. Intercalation of a molybdenum  $\eta^3$ -allyl dicarbonyl complex in a layered double hydroxide and catalytic performance in olefin epoxidation. *Dalton T.* 2013;42(23):8231-8240.



72. Gomes A. C., Bruno S. M., Abrantes M., Magalhaes C. I. R., Goncalves I. S., Valente A. A., Pillinger M. Catalytic olefin epoxidation with a carboxylic acid-functionalized cyclopentadienyl molybdenum tricarbonyl complex. *J Organomet Chem.* 2014;760:205-211.
73. Gomes A. C., Bruno S. M., Valente A. A., Gonçalves I. S., Pillinger M. Intercalation of a molybdenum(0)-tetracarbonyl-bipyridine complex in a layered double hydroxide. *J Organomet Chem.* 2013;744:53-59.
74. Li Feng, Duan Xue. Applications of Layered Double Hydroxides. In: Duan X, Evans D, editors. *Layered Double Hydroxides. Structure and Bonding.* 119: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 193-223.
75. Newman S. P., Jones W. Synthesis, characterisation and applications of layered double hydroxides containing organic guests. *New J Chem.* 1998;22(6):105-115.
76. Gago S., Pillinger M., Santos T. M., Rocha J., Gonçalves I. S. Synthesis and properties of Zn-Al layered double hydroxides containing ferrocenecarboxylate anions. *Eur J Inorg Chem.* 2004(7):1389-1395.
77. Auerbach S.M., Carrado K.A., Dutta P.K. *Handbook of Layered Materials:* CRC Press; 2004.
78. Ahmed A. A. A., Talib Z. A., bin Hussein M. Z., Zakaria A. In situ dielectric measurements of Zn-Al layered double hydroxide with anionic nitrate ions. *Solid State Sci.* 2012;14(8):1196-1202.
79. Meyn Martina, Beneke Klaus, Lagaly Gerhard. Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. *Inorg Chem.* 1990;29(26):5201-5207.
80. Dutta D., Tummanapelli A. K., Vasudevan S. Charge-Transfer-Driven Inclusion of Neutral TCNQ Molecules in the Galleries of a Layered Double Hydroxide: An Experimental and Computational Study. *J Phys Chem C.* 2013;117(8):3930-3939.
81. Carrado K. A., Forman J. E., Botto R. E., Winans R. E. Incorporation of Phthalocyanines by Cationic and Anionic Clays Via Ion-Exchange and Direct Synthesis. *Chem Mater.* 1993;5(4):472-478.
82. Uekawa N., Saito T., Kojima T., Kakegawa K. Preparation of oriented zinc oxide thin films by firing Zn-Al layered double hydroxide thin films. *Mater Lett.* 2012;86:125-128.

83. Carlino S., Hudson M. J. Thermal Intercalation of Layered Double Hydroxides - Capric Acid into an Mg,Al- LDH. *J Mater Chem.* 1995;5(9):1433-1442.
84. Del Hoyo C. Layered double hydroxides and human health: An overview. *Appl Clay Sci.* 2007;36(1-3):103-121.
85. Kuang Y., Zhao L. N., Zhang S. A., Zhang F. Z., Dong M. D., Xu S. L. Morphologies, Preparations and Applications of Layered Double Hydroxide Micro-/Nanostructures. *Materials.* 2010;3(12):5220-5235.
86. Choy J. H., Kwak S. Y., Park J. S., Jeong Y. J., Portier J. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J Am Chem Soc.* 1999;121(6):1399-1400.
87. Choy J. H., Kwak S. Y., Park J. S., Jeong Y. J. Cellular uptake behavior of [ $\gamma$ -P-32] labeled ATP-LDH nanohybrids. *J Mater Chem.* 2001;11(6):1671-1674.
88. Aisawa S., Takahashi S., Ogasawara W., Umetsu Y., Narita E. Direct intercalation of amino acids into layered double hydroxides by coprecipitation. *J Solid State Chem.* 2001;162(1):52-62.
89. Nakayama H., Wada N., Tsuchioka M. Intercalation of amino acids and peptides into Mg-Al layered double hydroxide by reconstruction method. *Int J Pharmaceut.* 2004;269(2):469-478.
90. Choi S. J., Choy J. H. Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity. *Nanomedicine-Uk.* 2011;6(5):803-814.
91. Zhang K., Xu Z. P., Lu J., Tang Z. Y., Zhao H. J., Good D. A., Wei M. Q. Potential for Layered Double Hydroxides-Based, Innovative Drug Delivery Systems. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):7409-7428.
92. Choy J. H., Choi S. J., Oh J. M., Park T. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Appl Clay Sci.* 2007;36(1-3):122-132.
93. Ookubo A., Ooi K., Hayashi H. Hydrotalcites as Potential Adsorbents of Intestinal Phosphate. *J Pharm Sci.* 1992;81(11):1139-1140.
94. Rives V., del Arco M., Martin C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Appl Clay Sci.* 2014;88-89:239-269.
95. Rives V., del Arco M., Martin C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. *J Control Release.* 2013;169(1-2):28-39.

96. Kura A. U., Hussein M. Z., Fakurazi S., Arulselvan P. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chem Cent J*. 2014;8:47-55.
97. Sugano K., Kansy M., Artursson P., Avdeef A., Bendels S., Di L., Ecker G. F., Faller B., Fischer H., Gerebtzoff G., Lennernaes H., Senner F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):597-614.
98. Wong Y. Y., Markham K., Xu Z. P., Chen M., Lu G. Q., Bartlett P. F., Cooper H. M. Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(33):8770-8779.
99. Choi S. J., Oh J. M., Choy J. H. Biocompatible Nanoparticles Intercalated with Anticancer Drug for Target Delivery: Pharmacokinetic and Biodistribution Study. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10(4):2913-2916.
100. Wang R. *Carbon Monoxide and Cardiovascular Functions*: CRC Press; 2002.
101. Atkin A. J., Lynam J. M., Moulton B. E., Sawle P., Motterlini R., Boyle N. M., Pryce M. T., Fairlamb I. J. S. Modification of the deoxy-myoglobin/carbonmonoxy-myoglobin UV-vis assay for reliable determination of CO-release rates from organometallic carbonyl complexes. *Dalton T*. 2011;40(21):5755-5761.
102. Suematsu M., Goda N., Sano T., Kashiwagi S., Egawa T., Shinoda Y., Ishimura Y. Carbon-Monoxide - an Endogenous Modulator of Sinusoidal Tone in the Perfused-Rat-Liver. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2431-2437.
103. Mori M., Suematsu M., Kyokane T., Sano T., Suzuki H., Yamaguchi T., Ishimura Y., Ishii H. Carbon monoxide-mediated alterations in paracellular permeability and vesicular transport in acetaminophen-treated perfused rat liver. *Hepatology*. 1999;30(1):160-168.
104. McLean S., Mann B. E., Poole R. K. Sulfite species enhance carbon monoxide release from CO-releasing molecules: Implications for the deoxymyoglobin assay of activity. *Anal Biochem*. 2012;427(1):36-40.
105. Sirs J. A. Kinetics of Reaction of Carbon-Monoxide with Fully Oxygenated Hemoglobin in Solution and Erythrocytes. *J Physiol-London*. 1974;236(2):387-401.
106. Mahoney J. J., Vreman H. J., Stevenson D. K., Vankessel A. L. Measurement of Carboxyhemoglobin and Total Hemoglobin by 5 Specialized Spectrophotometers (Co-Oximeters) in Comparison with Reference Methods. *Clin Chem*. 1993;39(8):1693-1700.

107. Mahoney J. J., Wong R. J., Vreman H. J., Stevenson D. K. Fetal Hemoglobin of Transfused Neonates and Spectrophotometric Measurements of Oxyhemoglobin and Carboxyhemoglobin. *J Clin Monitor.* 1991;7(2):154-160.
108. Vreman H. J., Wong R. J., Kadotani T., Stevenson D. K. Determination of carbon monoxide (CO) in rodent tissue: Effect of heme administration and environmental CO exposure. *Anal Biochem.* 2005;341(2):280-289.
109. Jaouen G., Salmain M. *Bioorganometallic Chemistry: Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging*; Wiley; 2015.
110. Pretsch Ernö, Bühlmann Philippe, Badertscher Martin. *IR Spectroscopy. Structure Determination of Organic Compounds*; Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 269-336.
111. Parida K. M., Sahoo M., Singha S. Synthesis and characterization of a Fe(III)-Schiff base complex in a Zn-Al LDH host for cyclohexane oxidation. *J Mol Catal a-Chem.* 2010;329(1-2):7-12.
112. MacLeod T. C. O., Kopylovich M. N., da Silva M. F. C. G., Mahmudov K. T., Pombeiro A. J. L. Copper(II) complexes of arylhydrazones of  $\beta$ -diketones immobilized on Zn-Al layered double hydroxides as effective recyclable catalysts for peroxidative oxidation of alkanes. *Appl Catal a-Gen.* 2012;439:15-23.
113. Evans David G, Slade Robert C T. *Structural Aspects of Layered Double Hydroxides*. In: Duan X, Evans D, editors. *Layered Double Hydroxides. Structure and Bonding*. 119: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 1-87.
114. Gago S., Pillinger M., Valente A. A., Santos T. M., Rocha J., Goncalves I. S. Immobilization of oxomolybdenum species in a layered double hydroxide pillared by 2,2'-bipyridine-5,5'-dicarboxylate anions. *Inorg Chem.* 2004;43(17):5422-5431.
115. Gomes A. C., Bruno S. M., Gamelas C. A., Valente A. A., Abrantes M., Goncalves I. S., Romao C. C., Pillinger M. Intercalation of a molybdenum  $\eta(3)$ -allyl dicarbonyl complex in a layered double hydroxide and catalytic performance in olefin epoxidation. *Dalton T.* 2013;42(23):8231-8240.
116. Klopogge J. T., Hickey L., Frost R. L. The effects of synthesis pH and hydrothermal treatment on the formation of zinc aluminum hydrotalcites. *J Solid State Chem.* 2004;177(11):4047-4057.

117. Abel E. W., Bennett M. A., Burton R., Wilkinson G. Transition-Metal Complexes of 7-Membered Ring Systems .1. The Cycloheptatriene-Metal Complexes and Related Compounds. *J Chem Soc.* 1958(Dec):4559-4563.
118. Linn D. E. An Accessible Mercury-Free Vacuum Schlenk Line for Air-Free Techniques. *J Chem Educ.* 2012;89(11):1479-1480.
119. Pangborn A. B., Giardello M. A., Grubbs R. H., Rosen R. K., Timmers F. J. Safe and convenient procedure for solvent purification. *Organometallics.* 1996;15(5):1518-1520.

