

Manuscrito Aceite

Título: Terapêutica Farmacológica da Leishmaniose: Perspetiva Atual e Desenvolvimento de Complexos de Ruténio Leishmanicidas

Autores: Nádia E. Santos, Filipe A. Almeida Paz, Susana S. Braga

Este manuscrito foi aceite após revisão por pares e aparece como um Manuscrito Aceite *online* antes de edição, provas e publicação formal da versão final (VF) no “QUÍMICA”. A VF será disponibilizada brevemente e pode ser ligeiramente diferente do Manuscrito Aceite como resultado de edição.

Os autores são responsáveis pelo conteúdo deste Manuscrito Aceite.

Disponível *online*: 04/11/2020



Terapêutica Farmacológica da Leishmaniose: Perspetiva Atual e Desenvolvimento de Complexos de Ruténio Leishmanicidas

^{1*}Nádia E. Santos, ²Filipe A. Almeida Paz, ¹Susana S. Braga

¹LAQV-REQUIMTE, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

²CICECO – Aveiro Institute of Materials, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Email: nadiaasantos@ua.pt

Resumo

A leishmaniose, uma doença parasitária infecciosa endémica de países tropicais, é cada vez mais uma preocupação mundial devido a fatores como o aquecimento global, a globalização e a atual Guerra Civil no Médio Oriente. Causada por diferentes espécies de parasitas pertencentes ao género *Leishmania*, a leishmaniose pode manifestar-se em três diferentes formas clínicas: cutânea (CL), muco cutânea (MCL) e visceral (VL). Os tratamentos aprovados até à data baseiam-se em sais de Sb(V) (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), anfotericina B (AmB), isotionato de pentamidina, miltefosina e agentes antifúngicos como o cetoconazol, o itraconazol e o fluconazol. A elevada incidência de efeitos secundários e de resistência à terapêutica atual cria a necessidade de se encontrarem novos possíveis agentes terapêuticos menos agressivos.

Os complexos de ruténio, graças a um conjunto de propriedades particulares deste metal (e.g., *redox*, baixa toxicidade e semelhanças ao ferro), são um grupo que tem vindo a chamar a atenção da comunidade científica, estando já descritos alguns compostos com atividade anti-*leishmania* e baixa toxicidade.

Com este artigo pretende-se dar a conhecer o impacto da doença da leishmaniose no mundo, o seu modo de propagação, as suas formas clínicas e tratamentos atuais, assim como apresentar alguns exemplos de complexos de Ru(II) e Ru(III) com atividade anti-parasitária. Abordar-se-á como o estado de oxidação do metal, a natureza e geometria do ligando e a existência duma coordenação completa são fatores determinantes para a atividade observada.

Abstract

Pharmacological Treatment of Leishmaniasis: Current Perspective and Development of Anti-leishmania Ruthenium Complexes. Leishmaniasis, an infectious disease typical from tropical countries, is growing to be a global health concern due to factors like global warming,

globalization, and middle eastern civil wars. Caused by various species of the *Leishmania* genus, leishmaniasis can manifest as three clinical forms: cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL) and visceral (VL). The approved treatments are based on Sb(V) salts (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate), amphotericin B (AmB), miltefosine and some anti-fungal agents such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole. The treatment is usually very toxic and aggressive (sometimes lethal) and often drug resistance is observed. For that reason, it is urgent to find new, less aggressive therapeutic agents.

Ruthenium complexes gather a very particular set of properties that are associated with the metal centre: redox properties, low toxicity and iron mimicking properties. Such feat has placed them on the spotlight of the scientific community. Some ruthenium compounds have already demonstrated anti-*leishmania* action associated with low toxicity.

In this paper, we discuss the global impact of leishmaniasis, presenting its propagation mode, clinical forms and current treatments. Emerging anti-*leishmania* Ru(II) and Ru(III) complexes are presented, with a brief discussion on the impact of the oxidation state, the nature and geometry of the ligand and the presence of a complete coordination towards activity.

1. Leishmaniose, uma doença tropical negligenciada

A leishmaniose é uma doença parasitária infecciosa causada por várias espécies de parasitas do género *Leishmania*, que pode desenvolver-se em humanos e cães. A sua principal incidência ocorre nos países de clima mais quente, estando classificada como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [1]. A sua distribuição geográfica já cobre, no entanto e nos dias de hoje, pelo menos 90 países com tendência expansiva motivada pelo aquecimento global que tem vindo a expandir o território dos flebotomíneos (*i.e.*, insetos responsáveis pela transmissão da doença) [2-3]. Um estudo baseado no comportamento de flebotomíneos das espécies *Neotoma floridana*, *N. micropus*, *Lutzomyia diabolica* e *L. antophora* (atualmente presentes no norte do México e no Texas), prevê a sua expansão para o centro dos Estados Unidos da América (EUA) e sul do Canadá, podendo inclusive em 2080 aumentar 70% o risco de infeção e possível desenvolvimento da doença na população norte-americana [4]. Um outro estudo prevê que entre 2060 e 2080 haverá um risco maior de transmissão de leishmaníase nos países da Europa central e do norte como resultado da presença de espécies com elevada competência como vetor, quer por deslocação territorial, como será o caso do *Phlebotomus perniciosus*, quer pela expansão territorial de *P. ariasi*, *P. mascittii*, e expansão territorial de *P. alexandri*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi* e *P. tobbi* [5].

A globalização também contribui para a propagação de doenças infecciosas. Não só se registou uma duplicação no número de viajantes internacionais [6], como também se verifica a internacionalização do intercâmbio e comercialização de produtos como o sangue e derivados [7], que presentemente não são testados para leishmaniose. Além disso, o número crescente de conflitos no Médio Oriente e Norte de África tem causado ondas de migração e a consequente criação de campos de refugiados onde os indivíduos vivem confinados em espaços pequenos, sem condições sanitárias e com fortes carências alimentares [8]. Estes campos têm sido o foco de surgimento de várias epidemias de leishmaniose.

A leishmaniose é, assim, um problema mundial, com os últimos dados da OMS, referentes a 2018, a reportar 1039 casos de leishmaniose cutânea (CL) (com exceção da Turquia que só em 2016 reportou 1089 casos importados) e 140 casos importados de leishmaniose visceral (VL) [1].

1.1. Formas clínicas

A leishmaniose inicia-se após a picada da mosca da areia, quando a forma promastigota do parasita é introduzida no sangue do indivíduo e há a consequente infeção das células imunitárias à volta do local (Figura 1). Esta pode evoluir para uma das três diferentes formas clínicas, classificadas como: cutânea (CL), confinada apenas à pele; mucocutânea (MCL), que afeta não apenas a pele, mas também as mucosas, e por fim a visceral (VL), a forma mais severa da doença que afeta a corrente sanguínea e órgãos viscerais.

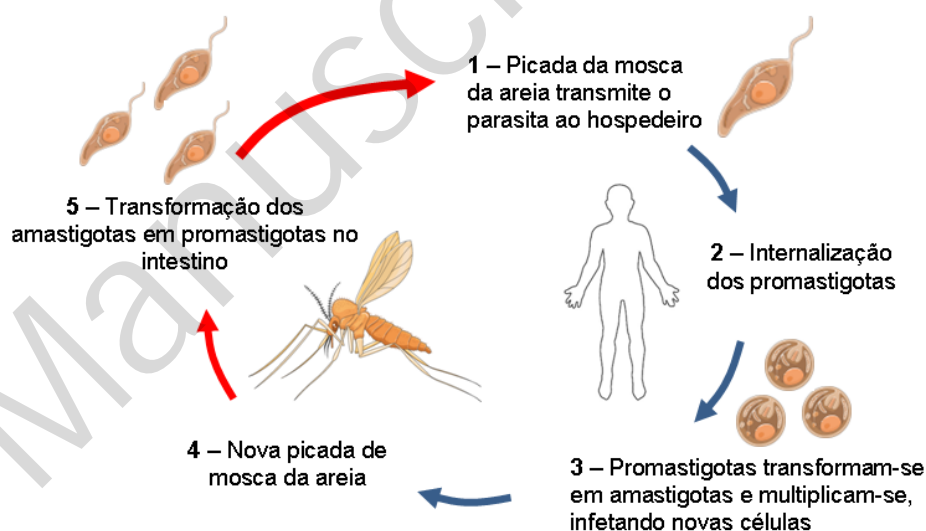


Figura 1 - Ciclo de vida dos parasitas do género *Leishmania* no corpo humano (a azul) e na mosca da areia (a vermelho). (imagens adaptadas da *Servier Medical Art by Servie*, [link: smart.servier.com](http://smart.servier.com))

1.1.1. Cutânea (CL)

A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais abundante, sendo frequente na América do Sul, Ásia, Europa e África. É também a forma mais comum em viajantes e em 2016 foi registado um total de 42 países com CL [1].

A doença manifesta-se por lesões cutâneas que se podem desenvolver semanas ou meses após a exposição. Estas lesões podem ser desde pápulas (idênticas às manifestadas em peles acneicas), placas nodulares e úlceras. Na maioria dos casos, as lesões desaparecem após alguns meses ou até dois anos depois do contágio, deixando o doente imune. No entanto, em doentes imunodeprimidos ou fragilizados, podem prevalecer durante anos [9].

A terapêutica usa essencialmente os sais de antimónio, com exceção dos EUA onde se usa preferencialmente o cetoconazole [10]. Em doentes sem acesso aos sais de antimónio, foram relatados tratamentos bem-sucedidos com itraconazole [11]. Estes medicamentos são injetáveis, no entanto podem ainda ser utilizados tratamentos tópicos em casos mais ligeiros.

1.1.2. Mucocutânea (MCL)

Frequente em países como o Brasil, Peru e Bolívia, a leishmaniose mucocutânea afeta os tecidos do nariz, do palato e da faringe. Pode causar desfiguramento facial provocado pela destruição parcial ou total das mucosas. A doença é também muitas vezes designada por “uta” nos países dos Andes [12], e em tempos da civilização peruana antiga, chegou a ser vista como um castigo divino. O tratamento segue as linhas gerais do indicado para a CL, onde são usados medicamentos injetáveis como o cetoconazole, o itraconazole e os sais de antimónio e/ou tratamentos tópicos em casos mais ligeiros, sendo adaptado de acordo com o diagnóstico de cada caso.

1.1.3. Visceral (VL)

A leishmaniose visceral ocorre principalmente no Brasil, no Este Africano e no Sudeste Asiático. É um tipo de manifestação da doença que afeta a corrente sanguínea e órgãos vitais tais como o baço, o fígado e a medula óssea. O seu período de incubação pode variar entre semanas a meses. Os sintomas são geralmente crises irregulares de febre, perda de peso, anemia e aumento do volume da víscera afetada. Quando não tratada, é fatal em 95% dos casos, contando assim com cerca de 70000 mortes anualmente [13-14]. O tratamento é, pois, essencial, sendo usados como medicamentos de primeira linha os sais de Sb(V) ou, nos EUA, a anfotericina B (AmB) ou a miltefosina. Os compostos da família dos “azóis” também podem ser utilizados quando o

diagnóstico mostra infecção por estirpes a eles sensíveis. Mais detalhes sobre cada tipo de medicamento, seu modo de atuação e efeitos secundários são apresentados na secção seguinte.

2. Medicamentos para o tratamento da leishmaniose – origens, modo de ação e complicações

A gama de medicamentos disponível para o tratamento da leishmaniose é relativamente pequena e inclui dois sais de antimónio pentavalente, a anfotericina B (AmB), o isotionato de pentamidina, a miltefosina e uma família de compostos designada genericamente por “azóis” - cetoconazol, itraconazol e fluconazol. De realçar que, com exceção dos sais de antimónio pentavalente, os restantes medicamentos para a leishmaniose já existiam comercialmente com outras indicações terapêuticas, tendo sido ampliado a sua gama de indicações. Por exemplo, a AmB e os “azóis” foram inicialmente desenvolvidos enquanto agentes antifúngicos e a miltefosina resultou de estudos para desenvolvimento de agentes antineoplásicos. Este facto ilustra a carência de esforços no desenvolvimento de novos fármacos para a leishmaniose.

2.1. Sais de antimónio pentavalente

Os compostos à base de Sb(V) aprovados para leishmaniose são o estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina (Figura 2). O uso de sais de antimónio para a leishmaniose já tem mais de um século, tendo sido reportado pela primeira vez em 1913 o tartarato de antimónio trivalente como agente para a VL [15]. Por ser um agente extremamente tóxico, foram realizados estudos subsequentes sobre os seus mecanismos de toxicidade, conduzindo consequentemente à descoberta dos sais de antimónio pentavalente correntemente em uso. Os compostos desta família foram reportados pela primeira vez na década de 1920 para o tratamento da VL [16] e têm-se mantido em uso, com mais ou menos alterações, até à data. Ainda assim, pelo facto de serem compostos amorfos, a elucidação da sua estrutura só recentemente foi conseguida. Para o antimoniato de meglumina comercial, por exemplo, estudos por espectrometria de massa sugerem que a forma mais abundante consiste em duas unidades de meglumina coordenadas com um ião de antimónio, mostrando ainda a presença de complexos do tipo 1:1, 2:2 e oligómeros de composição diversa [17]. O modo de atuação destes fármacos permanece por confirmar, havendo um modelo que sugere toxicidade intrínseca para Sb(V), enquanto que um segundo modelo aponta para redução *in vivo* a compostos de Sb(III) que, por sua vez, induzem apoptose [18].

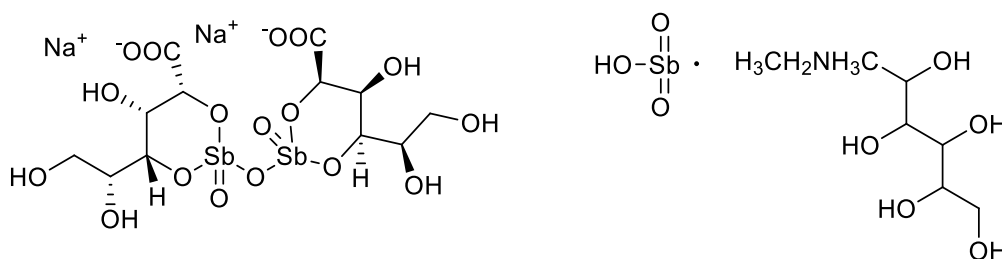


Figura 2 - Representação esquemática dos dois sais de antimónio pentavalente usados no tratamento da leishmaniose cutânea. À *esquerda*, estibogluconato de sódio, o único desta classe aprovado nos EUA; à *direita*, representação genérica do antimoniato de meglumina.

Os sais de antimónio pentavalente são recomendados pela OMS como fármacos de primeira linha para o tratamento de todos os tipos de leishmaniose [18]. Nos EUA, o único fármaco desta classe aprovado pela agência do medicamento norte-americana (FDA) é o estibogluconato de sódio, mas este é usado como medicamento de segunda linha, ou seja, quando os de primeira escolha (ver Secção 2.2) falham, quando os doentes são intolerantes a estes ou quando a estirpe lhes é resistente.

Os sais de antimónio pentavalente apresentam uma toxicidade considerável, sendo frequente, nas doses terapêuticas, a ocorrência de dores musculares e nas articulações, elevação de enzimas hepáticas e, mais raramente, cardiotoxicidade (que é grave em 9% dos doentes) [19].

2.2. Anfotericina B (AmB) - uma molécula pleiotrópica

A Anfotericina B (AmB) (Figura 3) é um agente antimicrobiano que apresenta atividade contra a *Leishmania spp* e certos fungos. Tem uma grande afinidade para lípidos, tais como as lipoproteínas (quando em circulação), e esteróis membranares, como o ergosterol da membrana do parasita [20-22]. Após ligação, forma canais iónicos capazes de desregular o balanço eletrólito e, consequentemente, causar a morte das células.

Durante vários anos, acreditou-se que a formação de poros membranares era o único modo de ação da AmB. Presentemente, sabe-se que é um composto pleiotrópico, ou seja, capaz de interferir com múltiplos alvos biomoleculares. Assim, para além da formação dos poros, a AmB liga-se ao ergosterol e causa bloqueio funcional [22], o que torna o parasita menos invasivo visto que o ergosterol é necessário para a fusão da membrana do parasita com a das células hospedeiras. A AmB também provoca formação de espécies reativas de oxigénio e aumento do nível de cálcio citosólico, causando a despolarização da membrana mitocondrial e consequente libertação do citocromo C (Cyt C) com ativação das caspases que levam à apoptose (uma forma programada de morte celular) [23]. A AmB tem ainda atividade imunoestimuladora por induzir a produção, por parte das células imunes do hospedeiro, de interleucinas, moléculas mediadoras da resposta imune [24-25].

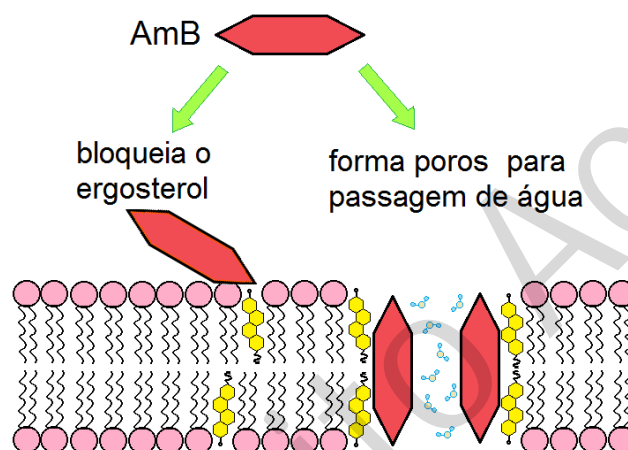
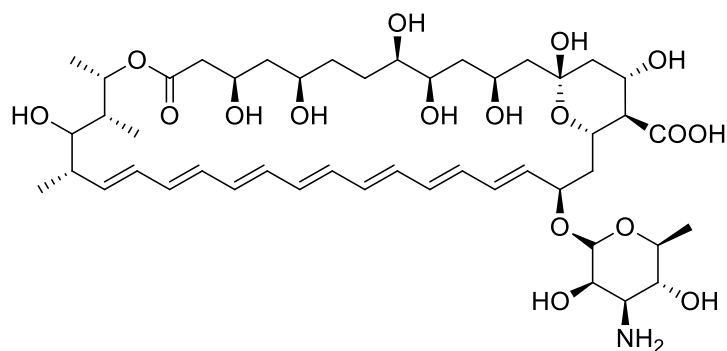


Figura 3 - Estrutura química da Anfotericina B (AmB), em *cima*, e esquema representativo dos seus efeitos sobre a membrana do parasita por ligação ao ergosterol, em *baixo*.

A AmB é administrada via endovenosa e usada no tratamento das três formas de leishmaniose. É o medicamento de primeira escolha em alguns países, como os EUA e o Bangladesh [26], e para pacientes co-infetados com VIH ou pacientes que apresentam resistência aos sais de Sb(V) [27-28]. Como desvantagem, é frequente o desenvolvimento de resistência por parte do parasita, o que se pensa resultar de mutações genéticas na enzima 14- α -desmetilase que conduz a alterações ao nível do metabolismo do ergosterol e consequente redução do mesmo [29]. Além disso, a superexpressão de genes como o LdAPx (gene da enzima ascorbato peroxidase) também foi detetada em estirpes de *L. donovani* resistentes à AmB, desempenhando um papel fundamental na proteção do efeito do stress oxidativo causado pelo medicamento [23]. Mais desvantagens incluem a possível ocorrência de efeitos tóxicos, que são mais comuns ao nível do rim mas podem também afetar o sistema nervoso central [30]. Em alguns pacientes, pode ocorrer reação anafilática logo após a injeção [26].

2.3. Miltefosina, um medicamento com múltiplas ações

A miltefosina (Figura 4) foi originalmente desenvolvida para atuar como agente antineoplásico. A sua estrutura química é análoga à dos fosfolípidos, o que lhe confere afinidade para vários alvos biomoleculares. Possui assim um leque de ações variado que inclui a sobre-expressão de metacaspases (enzimas pró-apoptóticas) [31], a perturbação da função da enzima reparadora celular metionina aminopeptidase 2 (MAP2) [32], o bloqueio da maquinaria de replicação celular [33], a perturbação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} [34,35] e a indução de stress oxidativo a nível mitocondrial [36].

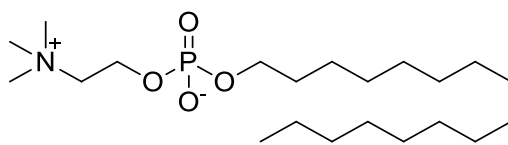


Figura 4 - Estrutura química da miltefosina.

A miltefosina está aprovada para o tratamento da leishmaniose desde 2002, sendo o único medicamento ativo por via oral que está disponível [37]. Por ter um bom tempo de semi-vida no paciente, pode ser usada em combinação, por exemplo com AmB que é dada em dose única, sendo seguida de tratamento ambulatorio com miltefosina por 28 dias [38]. Os efeitos secundários fazem-se sentir principalmente a nível gastrointestinal, o que está associado à forma de administração. Incluem náuseas, êmese e diarreia. Há risco moderado (2-3%) de toxicidade renal e hepática graves. No entanto, apesar das suas múltiplas ações, estudos clínicos já reportaram resistência à mesma por parte dos parasitas [39].

2.4. Isotionato de pentamidina

O isotionato de pentamidina (Figura 5) está aprovado nos EUA como medicamento órfão, exclusivamente para o tratamento de pneumonia causada pelo fungo unicelular *Pneumocystis carinii*. Possui também atividade contra tripanosomatídeos, sendo recomendado pela OMS para o tratamento da leishmaniose e fazendo parte da lista de medicamentos essenciais desta organização [40].

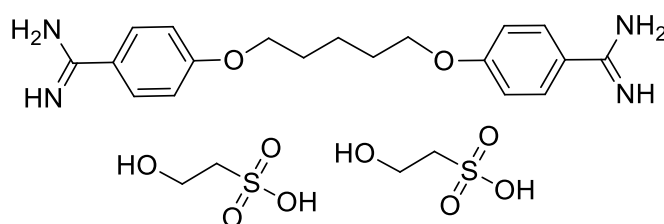


Figura 5 - Estrutura química do isotionato de pentamidina, aqui representado na sua forma neutra.

O seu modo de ação não está bem estabelecido, embora tenha já sido demonstrado que interfere com a síntese das bases do ADN [41]. Recentemente, mostrou-se também que a forma dicatiónica do medicamento liga-se covalentemente a uma proteína transmembranar do tipo aguagliceroporina [42], ou seja, uma proteína capaz de transportar água (e glicerol) através da membrana celular.

A forma ativa é a dicatiónica mas, a pH básico do lúmen intestinal, o medicamento encontra-se na forma neutra, mais apolar e menos solúvel, o que impede a sua absorção. Assim, tem de ser administrado por via endovenosa. Usa-se em primeira linha no tratamento de infeções por *Leishmania aethiopica* e como medicamento de segunda linha no tratamento de VL e CL com outras espécies a ele sensíveis. A principal limitação ao seu uso advém da possibilidade de causar toxicidade irreversível em alguns pacientes.

2.5. Cetoconazol, itraconazol e fluconazol, medicamentos alternativos para o tratamento da leishmaniose cutânea

Os medicamentos derivados do imidazol (cetoconazol) e dos triazóis (itraconazol e fluconazol – Figura 6) são genericamente denominados de ‘azóis’ e pertencem todos à classe dos agentes antifúngicos.

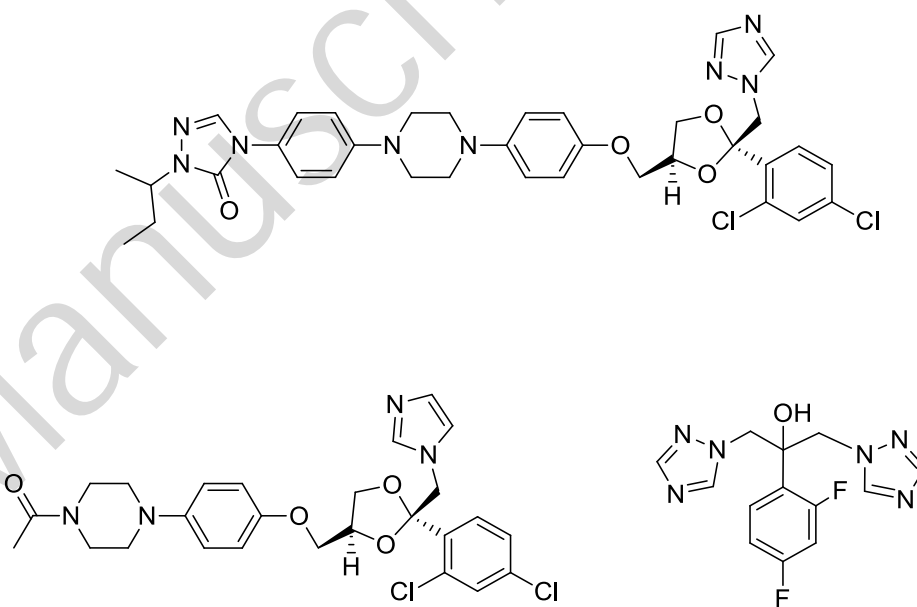


Figura 6 - Estrutura química dos agentes antifúngicos da família dos ‘azóis’ (itraconazol *em cima*, cetoconazol *à esquerda* e fluconazol *à direita*) utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea.

A sua atividade consiste em inibir a biossíntese de ergosterol por bloqueio da enzima lanosterol 14- α -desmetilase. O ergosterol é o principal esteroide na membrana celular de algumas leveduras e bolores [43-45], bem como na membrana celular dos parasitas da leishmaniose. O reaproveitamento deste grupo de medicamentos deve-se ao facto de terem a lanosterol 14- α -desmetilase como alvo comum [46].

Os ‘azóis’ são administrados por via oral no tratamento da CL (embora para alguns haja também formas injetáveis). O itraconazol não tem efeitos secundários de monta [47] e pode ser uma boa alternativa em pacientes que não respondem aos fármacos de primeira linha [11]. O cetoconazol e o fluconazole podem causar alguns efeitos secundários reversíveis, como a elevação das enzimas hepáticas, mas trazem a vantagem duma ação curativa em CL comparável à dos fármacos de primeira linha [48-49].

2.6. Limitações ao uso e perspectivas futuras

Dos medicamentos aqui apresentados, aqueles que são mais utilizados no tratamento da leishmaniose são, em geral, administrados de forma parenteral. Apenas a miltefosina e os ‘azóis’ são de uso oral, mas a miltefosina é uma droga de segunda escolha e as indicações terapêuticas dos ‘azóis’ são restritas à forma cutânea de leishmaniose. Mesmo novos agentes, como a paromomicina, aprovada para leishmaniose na Índia e em estudo em alguns países do norte de África [50], trazem uma repetição dos mesmos problemas e limitações: a paromomicina é um medicamento já comercializado como antibiótico, tem uma toxicidade não negligenciável e, mais uma vez, requer administração parentérica. Assim, a norma é que o tratamento implique injeção ou, no caso da AmB na forma lipossomal, perfusão, o que frequentemente provoca dor e inchaço no local da punção. Mais ainda, os regimes terapêuticos são prolongados, podendo demorar várias semanas e requerendo o internamento ou deslocações frequentes ao hospital com custos para o paciente. A este quadro soma-se a ocorrência de reações indesejáveis associadas à toxicidade dos medicamentos. Muitas vezes, o resultado é a desmotivação dos pacientes, que abandonam o tratamento antes de estar completo. Estas razões reforçam a necessidade de encontrar possíveis novos agentes terapêuticos contra a doença.

3. Em busca de novos fármacos – o papel dos complexos de ruténio

A descoberta de um tratamento universal para a leishmaniose continua a ser um enorme desafio, o que se deve, em grande parte, à complexidade da fisiopatologia da infeção. Neste sentido, estão a ser desenvolvidas várias linhas de investigação de novas moléculas ativas, que

incluem a avaliação de produtos naturais [51] e de novos compostos orgânicos derivados de farmacóforos conhecidos, como, por exemplo, azaesteróis, diamidinas aromáticas e 8-aminoquinolinas [50]. Existem também grandes esforços para a identificação de novos alvos terapêuticos por metodologias *in silico* [52-53] e o desenvolvimento de compostos metalo-orgânicos, que trazem uma maior diversidade estrutural e, por consequência, leque de ações [54].

Uma das abordagens a ter em consideração, logo no passo de síntese de novos agentes, é a sua atividade *redox* e a consequente contribuição para a acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que podem matar as células parasitárias. Neste sentido, os complexos metálicos têm ganho terreno na comunidade científica especializada na área. Em particular, foi observada atividade anti-*Trypanosomatidae* para complexos de ferro, rénio, manganésio e ruténio [54].

Os complexos de ruténio têm demonstrado resultados bastante promissores já que apresentam um conjunto de propriedades que os torna excelentes candidatos ao tratamento da leishmaniose: 1) as suas propriedades redox permitem-lhes interferir com os mecanismos antioxidantes dos parasitas [55]; 2) apresentam toxicidade significativamente inferior aos sais de antimónio(V) correntemente utilizados; 3) uma vez na circulação sanguínea do paciente, podem facilmente ser biotransportados por ligação à transferrina, o que evita interações indesejadas [55]; 4) apresentam elevada tolerabilidade graças às suas propriedades idênticas ao ferro. O ruténio pode ainda potenciar a atividade dos complexos contra os parasitas. De facto, foi já identificado um mecanismo celular de captação de ferro, bem como receptores da transferrina, em algumas espécies de *Leishmania*. Assim, e graças ao mimetismo Ru - Fe resultante do facto de pertencerem ao mesmo grupo da tabela periódica, as vias de entrada de ferro e seus compostos poderão oferecer formas privilegiadas de acesso dos complexos de Ru às células do parasita [56, 57].

Em muitos dos exemplos que se apresentam a seguir, é feita a coordenação de compostos orgânicos ativos contra a *Leishmania* com um precursor de ruténio para formar complexos inorgânicos seletivos. A atividade dos complexos resultantes é tipicamente superior à dos ativos orgânicos neles usados como ligando, pelo que alguns autores referem este efeito como ‘sinergia metal-ligando’.

3.1. Complexos inorgânicos de ruténio

Um dos exemplos mais paradigmáticos de complexos com sinergia metal-ligando data de 2014 e emprega o lapachol, um composto de origem botânica usado tradicionalmente para tratar vários tipos de infeções. Os complexos com ele formados estão representados na Figura 7. A sua esfera de coordenação está preenchida por ligandos de elevada inércia cinética (*i.e.*, pouco

lábéis), como a trifenilfosfina (PPh_3), e diferentes ligandos polipiridilo: 1,10-fenantrolina (phen) em **1**, 2,2'-bipiridina (bpy) em **2**, 4,4'-dimetilbipiridina em **3** e 4,4'-dimetoxibipiridina em **4**. As suas atividades são elevadas e bastante superiores à do lapachol, quer contra a forma promastigota, quer contra a forma amastigota, internalizada em macrófagos, de *L. amazonensis*. Contudo, também são tóxicos para macrófagos não infectados (da linha J744), conforme indicado pelos valores relativamente baixos de IC_{50} obtidos nestas células (Tabela 1) [58].

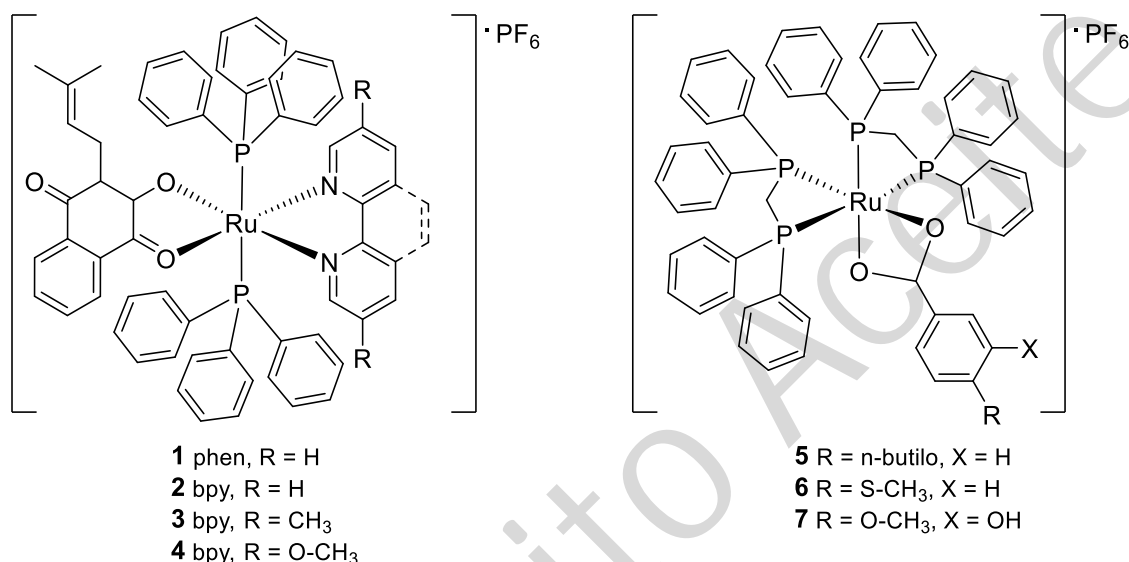


Figura 7 - Representação estrutural dos complexos de Ru(II) e fenilfosfinas que têm como ligandos ativos o lapachol (**1-4**) e *p*-alquilbenzoatos (**5-7**).

Outro estudo, conduzido em 2017 por Mônica S. Costa *et al.*, incidiu também sobre complexos de Ru(II) e ligandos fenilfosfina, que apresentam ainda três diferentes *p*-alquilbenzoatos como ligandos ativos (complexos **5-7** na Figura 7) [56]. Os alquilbenzoatos são compostos branqueadores por inibição da tirosinase [59], uma enzima que nos humanos está envolvida na produção de melanina e cuja expressão aumenta exageradamente nos doentes com leishmaniose [60]. Os complexos **5-7** apresentam boa atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*, com valores IC_{50} na ordem dos micromolar e, em alguns casos, já na ordem dos nanomolar (Tabela 1). Porém, tal como os da série anterior, apresentam alguma toxicidade contra macrófagos, o que poderá estar relacionado com a presença de ligandos de fenilfosfina, já que o precursor $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{P-CH}_2\text{-PPh}_2)_2\text{Cl}_2]$ (que só possui ligandos difenilfosfina, Ph_2P , e dois átomos cloro) também apresenta toxicidade assinalável em macrófagos (última linha da Tabela 1). De facto, a segurança toxicológica das fenilfosfinas carece de mais estudos, conhecendo-se apenas a toxicidade por inalação de fenilfosfina e trifenilfosfina em ratos. Nestes modelos animais, os valores de LD_{50} foram determinados em

1,55 e 47,8 $\mu\text{mol/L}$, respetivamente (concentração expressa em micromoles por volume atmosférico) [61].

Tabela 1 - Atividade leishmanicida dos complexos **1-7** em comparação com o lapachol e com o precursor $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{P-CH}_2\text{-PPh}_2)_2\text{Cl}_2]$ (Ph = fenilo).

Composto	<i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ (μM)		<i>L. braziliensis</i> IC ₅₀ (μM)	<i>L. infantum</i> IC ₅₀ (μM)	Macrófagos, IC ₅₀ (μM)
	promastigotas	amastigotas	promastigotas	promastigotas	
1	> 10	0,07 \pm 0,002	—	—	0,33 \pm 0,08
2	0,18 \pm 0,04	0,17 \pm 0,01	—	—	1,0 \pm 0,46
3	0,42 \pm 0,03	> 10	—	—	6,7 \pm 1,3
4	1,60 \pm 0,44	n.d.	—	—	1,9 \pm 1,3
Lapachol	12,4 \pm 0,69	> 10	—	—	> 10
5	7,52	—	9,09	12,59	8,73
6	0,70	—	3,28	3,17	1,85
7	0,52	—	0,86	1,75	2,14
Precursor	15,48	—	3,93	19,46	62,24

Notas: Os valores de IC₅₀ são expressos como média \pm s.d, excepto quando o s.d. não foi disponibilizado na literatura; n.d. significa não determinado.

Os compostos **1-4** e o lapachol foram testados com 72h de tempo de incubação e a sua toxicidade avaliada em macrófagos de rato da linha J774; os compostos **5-7** e precursor foram testados com 24h de tempo de incubação e a sua toxicidade avaliada em macrófagos de rato da linha RAW 264.7.

Também em 2017, Marzena Fandzloch *et al.* reportaram complexos de Ru(II) e Ru(III) com ligandos lábeis como o cloro e o dimetilsulfóxido (DMSO) tendo apenas um ligando ativo: um análogo da purina. Os complexos foram testados contra promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. donovani* [62]. O estudo demonstrou a presença de sinergia de ação metal-ligando, mostrando ainda que a geometria de coordenação e o estado de oxidação do Ru são fatores determinantes na atividade. Os dois complexos mais potentes, **8** e **9**, estão representados na Figura 8. Note-se que estes apresentam diferentes estados de oxidação para o ruténio, que é Ru(II) para o complexo **8** e Ru(III) para o complexo **9**. Esta diferença traduz-se numa rápida hidrólise em meio aquoso do complexo **9**; porém, a adição de cloreto de sódio ao meio induz igualmente a rápida hidrólise do complexo **8**, pelo que *in vivo* poderão ter perfis semelhantes. O complexo **8** é o mais ativo, com valores de IC₅₀ a oscilar entre 9,2 \pm 0,7 e 41,8 \pm 3,3 μM (dependendo da espécie de *Leishmania*), enquanto que com **9** os valores se situam entre 46,1 \pm 3,7 e 62,0 \pm 4,9 μM . Estes complexos têm a grande vantagem de se mostrar inócuos em estudos *in vitro*, com toxicidade em macrófagos e células epiteliais de rim (linha Vero) a apresentar valores de IC₅₀ acima de 300 μM para **8** e de 800 μM para **9**. Ainda assim, deve ressaltar-se que a presença de ligandos lábeis, com espectável hidrólise *in vivo* rápida e fácil, poderá implicar a sua interação com um maior número de alvos do hospedeiro. Poderá, portanto, perder-se alguma atividade por interação com múltiplos alvos, bem como surgir algum efeito tóxico indesejado.

Estudos futuros deverão incluir a avaliação, em modelos animais, da dose eficaz e da segurança destes complexos, para melhor se compreender a sua viabilidade como novos agentes terapêuticos.

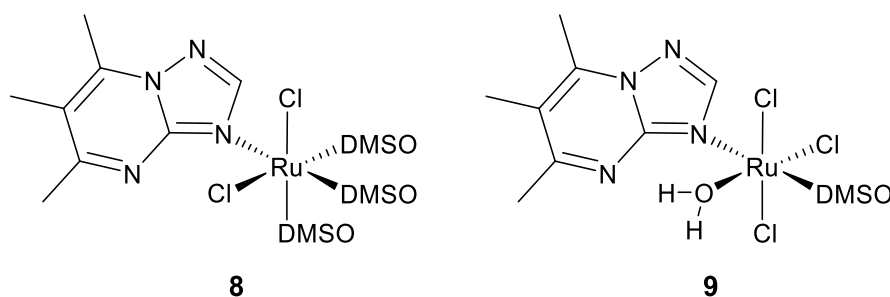


Figura 8 - Estrutura química dos dois complexos mais potentes do estudo conduzido por Marzena Fandzloch *et al.*: **8** *cis, fac*-[RuCl₂(dmsol)₃(tntp)] e **9** *mer*-[RuCl₃(dmsol)(OH₂)(tntp)]·2H₂O (tntp = 5,6,7-trimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]-pirimidina) [62].

3.2. Complexos organometálicos de ruténio

Os complexos organometálicos de ruténio (caracterizados por uma ligação C-Ru) também têm sido um importante foco de estudo enquanto candidatos a novos agentes leishmanicidas, nomeadamente os complexos de ruténio e arenos com geometria do tipo ‘banco de piano’ (Figura 9). Estes trazem as vantagens de permitir incorporar uma variedade vasta de ligandos (X, Y, Z) e de grupos funcionais no anel areno (R), e de usar diferentes anéis na posição do areno, sendo mais comuns o arilo ou o ciclopentadienilo. A diversidade estrutural é importante para modular as propriedades físico-químicas e bioquímicas destes complexos e, consequentemente, a sua atividade biológica.

Os exemplos mais relevantes de complexos organometálicos de ruténio para tratar a leishmaniose advêm de estudos conduzidos por A. Sánchez-Delgado *et al.* que, entre 2012 e 2013, sintetizaram duas famílias de complexos de ruténio com *p*-cimenol (4-metilisobutilbenzeno): uma tendo como ligando ativo o cetoconazole (KTZ) [54], e outra tendo o clotrimazole (CTZ) [55,63,64]. Regra geral, a atividade anti-parasitária destes complexos é superior à dos respectivos ‘azóis’, confirmando-se a ocorrência de sinergia metal-ligando. Os compostos mais ativos das duas famílias estão representados na Figura 9. Os complexos com CTZ, **10** e **11**, destacam-se pela sua elevada atividade contra promastigotas de *L. major*, já na ordem dos nanomolar. Por outro lado o complexo com KTZ é o que apresenta melhor margem de segurança, com uma atividade leishmanicida de 0,8 µM e ausência de toxicidade *in vitro* em todas as linhas celulares de mamífero em que foi testado (Tabela 2). Os complexos **10** e **11** foram

também testados contra amastigotas de *L. major* internalizados em macrófagos peritoneais de ratos, com bons resultados ($IC_{70} = 29 \text{ nM}$ para **10** e $IC_{40} = 1 \text{ }\mu\text{M}$ para **11**).

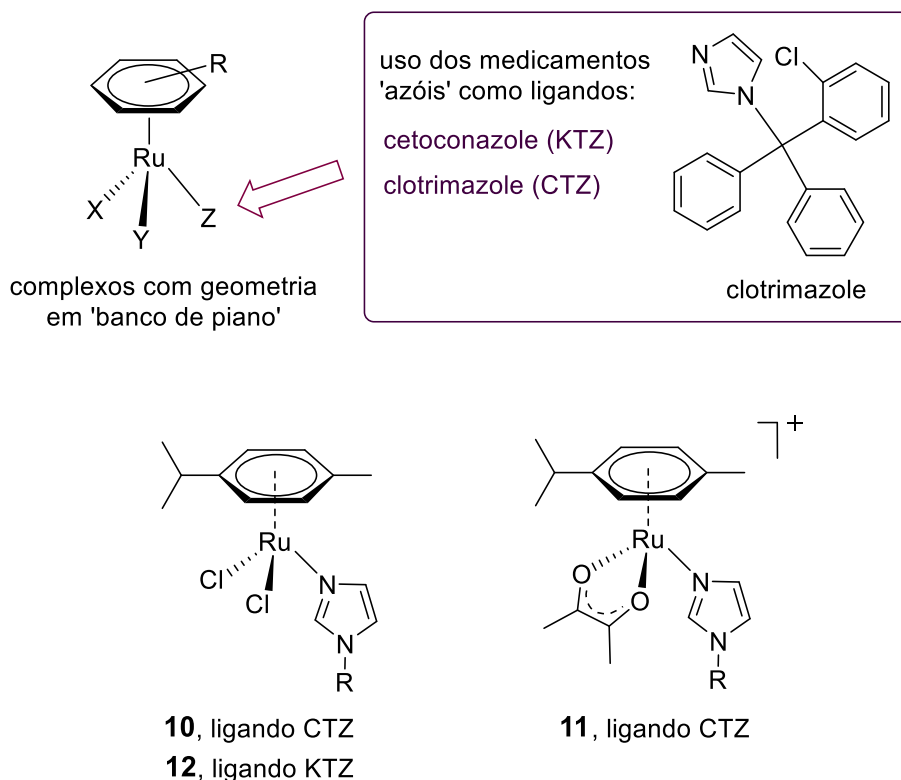


Figura 9 - Representação esquemática da geometria de complexos organometálicos do tipo 'banco de piano' e estruturas químicas dos complexos **10-12**, que contêm como ligandos ativos o clotrimazole (CTZ) ou o cetoconazole (KTZ) [62,63].

Tabela 2 - Actividade leishmanicida dos complexos **10-12** em comparação com o clotrimazole e o cetoconazole.

Composto	<i>L. major</i> promastigotas IC_{50} (μM)	Macrófagos IC_{50} (μM)	Células tipo osteoblasto IC_{50} (μM)	Fibroblastos IC_{50} (μM)
10	$0,015 \pm 0,004$	—	$> 7,5$	—
11	$0,45 \pm 0,15$	—	$6,55 \pm 1,69$	—
clotrimazole	$1,6 \pm 0,5$	—	$> 7,5$	—
12	$0,8 \pm 1,32$	$> 7,5$	120	> 120
cetoconazole	$1,9 \pm 0,5$	$> 7,5$	120	> 120

Notas: Os valores de IC_{50} são expressos como média \pm s.d.; os compostos **10**, **11**, **13**, cetoconazole e clotrimazole foram testados com 96h de tempo de incubação; a sua toxicidade foi avaliada em macrófagos de rato (linha RAW 264.7) e células humanas (fibroblastos da linha Hs27 e osteosarcoma da linha U2-OS HTB-96, que mimetiza o osteoblasto).

4. Conclusão

A procura de novos agentes terapêuticos para a leishmaniose tem sido cada vez mais urgente devido ao aumento da sua taxa de propagação pelo mundo inteiro, aliada aos problemas associados aos tratamentos atuais, que se revelam pouco eficazes.

Na vasta gama de possíveis novos tratamentos, os complexos metálicos de ruténio têm emergido na comunidade científica como potenciais novos medicamentos devido às suas propriedades. Como se pretendeu demonstrar ao longo deste artigo, estes complexos de ruténio, enquanto agentes anti-*leishmania*, são bastante promissores, apresentando uma atividade superior quando comparados à dos seus ligandos isolados. Além disso, muitos destes complexos demonstraram ser seletivos, não apresentando toxicidade significativa para com os macrófagos.

Em suma, podemos concluir que os complexos de ruténio são uma família de compostos promissora para a atividade anti-*leishmania*, mas que ainda carecem de mais estudos sistemáticos e do desenvolvimento de uma mais ampla variedade de estruturas para se poder compreender melhor a relação entre algumas características (como o estado de oxidação do metal, a natureza e geometria do ligando, entre outros) e a sua atividade. Estudos atempados poderão dar origem a uma biblioteca de novos compostos, e suscitar novas áreas de investigação, para que a leishmaniose não venha a ser um problema em países como Portugal daqui a umas décadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Aveiro e aos FCT/MCTES (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) o financiamento concedido aos laboratórios associados CICECO (UIDB/50011/2020 & UIDP/50011/2020) e LAQV-REQUIMTE (ref UIDB/50006/2020), bem como o suporte da unidade de investigação QOPNA.

Referências

- [1] “World Health Organization (WHO), Leishmaniasis - Situation and trends. Global health observatory (GHO) data.,” 2018: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. (Acedido em 25-03-2020).
- [2] D. Steverding, *Parasites and Vectors*. **2017**, *10*, 1-10. doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5.
- [3] I. A. Rodrigues, A. M. Mazotto, V. A. Cardoso, R. L. Alves, A. C. F. Amaral, J. R. A. Silva, A. S. Pinheiro and A. B. Vermelho, *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015* 1-12. doi.org/10.1155/2015/835910.

- [4] C. González, O. Wang, S. E. Strutz, C. González-Salazar, V. Sánchez-Cordero, and S. Sarkar, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, 1-16. doi.org/10.1007/s10847-019-00885-y.
- [5] L. K. Koch, J. Kochmann, S. Klimpel, and S. Cunze, *Scientific Reports.* **2017**, *7*, 1-10. doi.org/10.1038/s41598-017-13822-1.
- [6] A. C. Pasquale Mansueto, Aurelio Seidita, Giustina Vitale, *Travel Med. Infect. Dis.* **2014**, *12*, 563-581. doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.09.007.
- [7] J. Shaw, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2007**, *102*, 541-546. doi.org/10.1590/S0074-02762007000500001.
- [8] R. Du, P. J. Hotez, W. S. Al-Salem, and A. Acosta-Serrano, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1-11. doi.org/10.1007/s10847-019-00885-y.
- [9] W. H. Markle and K. Makhoul, *Am. Fam. Physician.* **2004**, *69*, 1455-1460.
- [10] “Global Health - Division of Parasitic Diseases: Parasites - Leishmaniasis. Resources for Health Professionals. Centers for Disease Control and Prevention,” 2018: https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html. (Acedido em 25-03-2020).
- [11] J. Consigli, C. Danielo, V. Gallerano, M. Papa, and A. Guidi, *Int. J. Dermatol.* **2006**, *45*, 46-49. doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02429.x.
- [12] E. Martinson, K. J. Reinhard, J. E. Buikstra, and K. D. De La Cruz, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2003**, *98*, 195-205. doi.org/10.1590/S0074-02762003000900029.
- [13] R. Arenas, E. Torres-Guerrero, M. R. Quintanilla-Cedillo, and J. Ruiz-Esmenjaud, *F1000Res.* **2017**, *6*, 1-15. doi.org/10.12688/f1000research.11120.1.
- [14] “World Health Organization (WHO): Leishmaniasis key facts. WHO,” 2020: <https://www.who.int/news-room/fact-sheet>. (Acedido em 25-03-2020).
- [15] G. Vianna, *7 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo.* **1912**, *4*, 426-428.
- [16] U. N. Brahmachari, "A Treatise on Kala.azar", John Bale, Sons & Danielsson, Ltd., Londres, GB, **1928**.
- [17] F. Frézard, C. Demicheli, and R. R. Ribeiro, *Molecules.* **2009**, *14*, 2317-2336. doi.org/10.3390/molecules14072317.
- [18] G. Sudhandiran and C. Shaha, *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 25120-25132. doi.org/10.1074/jbc.M301975200.
- [19] S. Sundar and J. Chakravarty, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2010**, *7*, 4267-4277. doi.org/10.3390/ijerph7124267.
- [20] Gray, Kaitlyn C., Palacios, Daniel S., Dailey, Ian, Endo, Matthew M., Uno, Brice E., Wilcock, Brandon C., Burke, Martin D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 2234–2239. doi.org/10.1073/pnas.1117280109.
- [21] T. E. Andreoli, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *235*, 448–468. doi.org/10.1111/j.1749-

- [22] J. Bolard, *BBA - Rev. Biomembr.* **1986**, 864, 257–304. [doi.org/10.1016/0304-4157\(86\)90002-X](#).
- [23] A. Kumar, S. Das, B. Purkait, A. H. Sardar, A. K. Ghosh, M. R. Dikhit, K. Abhishek, and P. Das, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 6172–6184. [doi.org/10.1128/AAC.02834-14](#).
- [24] K. Sau, S. S. Mambula, E. Latz, P. Henneke, D. T. Golenbock, and S. M. Levitz, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 37561–37568. [doi.org/10.1074/jbc.m306137200](#).
- [25] P. D. Rogers, J. K. Stiles, S. W. Chapman, and J. D. Cleary, *J. Infect. Dis.* **2000**, 182, 1280–1283. [doi.org/10.1086/315835](#).
- [26] P. Nath, A. Basher, M. Harada, S. Sarkar, S. Selim, R. J. Maude, E. Noiri, and A. Faiz, *Trop. Doct.* **2014**, 44, 241–242. [doi.org/10.1177/0049475514543655](#).
- [27] S. Sundar, J. Chakravarty, *J. Glob. Infect.* **2010**, 2, 159–166.
- [28] S. S. Braga, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, 93, 145–155. [doi.org/10.1007/s10847-019-00885-y](#).
- [29] R. Mwenechanya, J. Kovářová, N. J. Dickens, M. Manikhandan, P. Herzyk, I. S. Vincent, S. T. Weidt, K. E. Burgess, R. J. S. Burchmore, A. W. Pountain, T. K. Smith, D. J. Creek, D. H. Kim, G. I. Lepesheva and M. P. Barrett, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, 1–21. [doi.org/10.1371/journal.pntd.0005649](#).
- [30] J. S. Glasser and C. K. Murray, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, 84, 566–568. [doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0662](#).
- [31] S. Khademvatan, M. J. Gharavi, and J. Saki, *Brazilian J. Infect. Dis.* **2011**, 15, 442–448. [doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70225-2](#).
- [32] R. Kumar, K. Tiwari, and V. K. Dubey, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 95. [doi.org/10.1038/s41598-017-00186-9](#).
- [33] S. Azzouz, M. Maache, R. G. Garcia, and A. Osuna, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 96, 60–65.
- [34] A. K. Pinto-Martinez, J. Rodriguez-Durán, X. Serrano-Martin, V. Hernandez-Rodriguez, and G. Benaim, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62, 1–10. [doi.org/10.1128/AAC.01614-17](#).
- [35] G. Benaim, Y. García-Marchán, C. Reyes, G. Uzcanga, and K. Figarella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 430, 1091–1096. [doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.033](#).
- [36] I. M. Vincent, G. Racine, D. Légaré, and M. Ouellette, *Proteomes.* **2015**, 3, 328–346. [doi.org/10.3390/proteomes3040328](#).
- [37] T. Sunyoto, J. Potet, and M. Boelaert, *BMJ Glob. Health.* **2018**, 3, 1–10.
- [38] S. Sundar and P. L. Olliaro, *Ther. Clin. Risk Manag.* **2007**, 3, 733–740.

- [39] G. A. S. Romero, D. L. Costa, C. H. N. Costa, R. P. de Almeida, E. V. de Melo, S. F. G. de Carvalho, A. Rabello, A. L. de Carvalho, A. Q. Sousa, R. D. Leite, S. S. Lima, T. A. Amaral, F. P. Alves, and J. Rode, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 1–25. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706.
- [40] World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325771>. (Acedido a 31-03-2020).
- [41] R. S. Bornstein and J. W. Yarbrow, *J. Surg. Oncol.* **1970**, *2*, 393–398. doi.org/10.1002/jso.2930020412.
- [42] J. Song, N. Baker, M. Rothert, B. Henke, L. Jeacock, D. Horn and E. Beitz, *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, 1–14. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005436.
- [43] M. Bard, N. D. Lees, T. Turi, D. Craft, L. Cofrin, R. Barbuch, C. Koegel and J. C Loper, *Lipids.* **1993**, *28*, 963–967. doi.org/10.1007/BF02537115.
- [44] Q. Z. Lv, L. Yan and Y. Y. Jiang, *Virulence.* **2016**, *7*, 649–659. doi.org/10.1080/21505594.2016.1188236.
- [45] R. S. Shapiro, N. Robbins, and L. E. Cowen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 213–267. doi.org/10.1128/MMBR.00045-10.
- [46] L. I. McCall, A. El Aroussi, J. Y. Choi, D. F. Vieira, G. De Muylder, J. B. Johnston, S. Chen, D. Kellar, J. L. Siqueira-Neto, W. R. Roush, L. M. Podust and J. H. McKerrow, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, 1–17. doi.org/10.1371/journal.pntd.0003588.
- [47] J. Dogra and V. N. Saxena, *Int. J. Parasitol.* **1996**, *26*, 1413–1415. [doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00128-2).
- [48] E. Saenz and D. Berman, *Am. J. Med.* **1990**, *89*, 147–155. [doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90292-L](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90292-L).
- [49] A. A. Alrajhi, E. A. Ibrahim, E. B. De Vol, M. Khairat, R. M. Faris, and J. H. Maguire, *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 891–895. doi.org/10.1056/NEJMoa011882.
- [50] K. Seifert, *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 31–39. doi.org/10.2174/1874104501105010031.
- [51] A. G. T. J. H. G. Lago, “Natural Products as a Source of New Drugs Against Leishmania,” in *Drug Discovery For Leishmaniasis*. L. Rivas, C. Gil, Eds, RSC Publishing. **2008**, pp. 179–198.
- [52] N. E. C. C. Roca, V. Sebastián-Pérez, “In silico Tools for Target Identification and Drug Molecular Docking in Leishmania,” in *Drug Discovery For Leishmaniasis*. L. Rivas, C. Gil, Eds, RSC Publ, pp. 130 – 152.
- [53] A. H. Romero and S. E. López, *J. Mol. Graph. Model.* **2017**, *76*, 313–329. doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.07.013.
- [54] D. Gambino and L. Otero, *Inorg. Chim. Acta.* **2018**, *472*, 58–75. doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.068.

- [55] R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, and B. K. Keppler, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 2925–2932. doi.org/10.1039/C3SC53243G.
- [56] M. S. Costa, Y. G. Gonçalves, D. C.O. Nunes, D. R. Napolitano, P. I. S. Maia, R. S. Rodrigues, V. M. Rodrigues, G. Von Poelhsitz and K. A. G. Yoneyama, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 175, 225–231. doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.023.
- [57] M. Reyes-López, C. Piña-Vázquez, and J. Serrano-Luna, *BioMed Res. Int.* **2015**, 2015, 1–12. doi.org/10.1155/2015/641392.
- [58] M. I. F. Barbosa, R. S. Corrêa, K. M. de Oliveira, C. Rodrigues, J. Ellena, O. R. Nascimento, V. P. C. Rocha, F. N. Nonato, T. S. Macedo, J. M. Barbosa-Filho, M. B. P. Soares and A. A. Batista, *J. Inorg. Biochem.* **2014**, 136, 33–39. doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.009.
- [59] X. H. Huang, Q. X. Chen, Q. Wang, K. K. Song, J. Wang, L. Sha and X. Guan, *Food Chem.* **2006**, 94, 1–6. doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.008.
- [60] N. Dogra, C. Warburton, and W. R. McMaster, *Infect. Immun.* **2007**, 75, 3506–3515. doi.org/10.1128/IAI.00277-07.
- [61] R. S. Waritz and R. M. Brow, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1975**, 36, 452–458. doi.org/10.1080/0002889758507270.
- [62] M. Fandzloch, J. M. M. Arriaga, M. Sánchez-Moreno, A. Wojtczak, J. Jezierska, J. Sitkowski, J. Wiśniewska, J. M. Salas and I. Łakomska, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 176, 144–155. doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.018.
- [63] A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sánchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, RA Maldonado and R. A. Sánchez-Delgado, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 3867–3877. doi.org/10.1021/jm300070h.
- [64] E. Iniguez, A. Sánchez, M. A. Vasquez, A. Martínez, J. Olivas, A. Sattler, R. A. Sánchez-Delgado and R. A. Maldonado, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, 18, 779–790. doi.org/10.1007/s00775-013-1024-2.