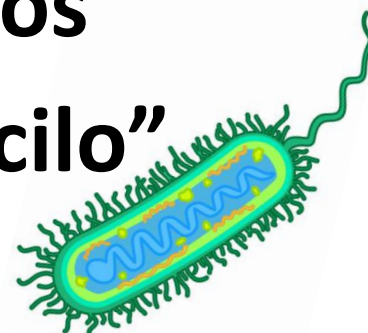
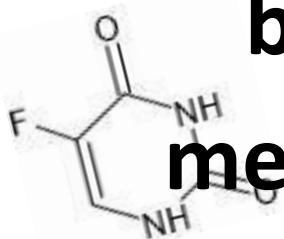




**Universidad**  
Zaragoza

*Trabajo Fin de Grado*

# “Desarrollo de nuevos agentes antibacterianos basados en complejos metálicos de 5-Fluoracilo”



**Autor**

Ricardo Jesús Ferrando Rodríguez

**Directoras**

Elena Cerrada Lamuela

Elena Atrián Blasco

**Departamento de Química Inorgánica**

Facultad de Ciencias y Campus Río Ebro

**2021**

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Objetivos y planteamiento del trabajo</b> .....	3
<b>3. Discusión y resultados</b> .....	4
3.1. Obtención de $[Au(5-FU)(PR_3)]$ y $[Au_2(5-FU)(PR_3)_2]$ .....	4
3.1.1. Síntesis de $[Au(5-FU)(PTA)]$ (1) y $[Au_2(5-FU)(PTA)_2]$ (2).....	5
3.1.2. Síntesis de $[Au(5-FU)(PPh_3)]$ (3).....	6
3.1.3. Síntesis de $[Au(5-FU)(TPPTS)]$ (4) .....	7
3.1.4. Síntesis de $[Au(5-FU)(DAPTA)]$ (5) .....	8
3.1.5. Síntesis de $[Au(5-FU)(HMPT)]$ (6) .....	9
3.2. Ensayos de estabilidad .....	10
3.2.1. Medida de estabilidad mediante absorción UV-vis .....	10
3.2.2. Medida de estabilidad en presencia de NAC-ME con RMN .....	11
3.3. Medidas de la actividad antibacteriana .....	12
3.4. Visualización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	15
<b>4. Sección experimental</b> .....	17
4.1. Equipos y técnicas experimentales para determinación estructural.....	17
4.1.1. Resonancia magnética nuclear.....	17
4.1.2. Espectroscopía infrarroja .....	17
4.1.3. Espectrometría de masas .....	17
4.2. Preparación de los productos de partida.....	17
4.2.1. Síntesis de $[AuCl(tht)]$ .....	17
4.2.2. Síntesis de DAPTA .....	18
4.2.3. Preparación de clorofosfinas de oro (I): $[AuCl(PR_3)]$ .....	18
4.3. Preparación de complejos $[Au_x(5-FU)(PR_3)_x]$ ( $PR_3 = PTA, DAPTA, PPh_3, TPPTS$ y $HMPT, x = 1$ ó $2$ ).....	19
4.3.1. Síntesis de $[Au(5-FU)(PTA)]$ (1).....	19
4.3.2. Síntesis de $[Au_2(5-FU)(PTA)_2]$ (2) .....	19
4.3.3. Síntesis de $[Au(5-FU)(PPh_3)]$ (3).....	19
4.3.4. Síntesis de $[Au(5-FU)(TPPTS)]$ (4) .....	19
4.3.5. Síntesis de $[Au(5-FU)(DAPTA)]$ (5) .....	19
4.3.6. Síntesis de $[Au(5-FU)(HMPT)]$ (6) .....	19
4.4. Ensayos de estabilidad .....	20

4.4.1. Medida de estabilidad mediante absorción UV-vis .....	20
4.4.2. Medida de estabilidad en presencia de NAC-ME con RMN .....	20
4.5. Ensayos de actividad antimicrobiana .....	21
4.5.1. Bacterias y disolución de medio de cultivo .....	21
4.5.2. Disoluciones madre de los compuestos .....	21
4.5.3. Preparación de la disolución de bacteria .....	21
4.5.4. Determinación de MIC .....	21
4.5.5. Determinación de MBC .....	21
4.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	22
4.6.1. Preparación de bacterias .....	22
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Referencias .....</b>	<b>24</b>

## Resumen

En este trabajo fin de grado se han sintetizado complejos de oro(I) del tipo  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$  y  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_2]$ . Para ello se emplearon como ligandos: 5-FU (5-fluoroacilo) y  $\text{PR}_3$  las fosfinas PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), DAPTA (3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfabicyclo[3.3.1]nonano), TPPTS (m- trifenilfosfinatrisulfonada), HMPT (trisdimetilamino fosfano) y  $\text{PPh}_3$  (trifenilfosfina).

Todos los compuestos preparados fueron caracterizados mediante diferentes técnicas: RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ , IR (ATR) y espectrometría de masas. A partir de la información espectroscópica obtenida se dedujo que los complejos  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**),  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**),  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**),  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) y  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) se formaron satisfactoriamente.

Además, se evaluó la farmacocinética de estos compuestos. Para ello se midieron sus espectros de absorción UV-vis durante 24 horas a 37 °C en PBS. También se midieron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  en presencia de NAC-ME (N-acetilcisteína metilester) al instante de su adición y después de 24 horas. Aparentemente los complejos resultaron ser estables en las condiciones de los experimentos.

También se estudió la actividad antibacteriana de los complejos sintetizados frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para ello se midieron las MIC mediante el método de *broth dilution method* y las MBC mediante el método de la resazurina. Los complejos resultaron tener una gran actividad antibacteriana generalmente con MIC desde 256 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos complejos tienen una mayor actividad antibacteriana contra *B. subtilis* (Gram+) que contra *E. coli* (Gram-) posiblemente debido a su diferente conformación y composición de la pared celular.

Finalmente se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) los daños externos de las bacterias a valores cercanos o iguales al MIC de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**),  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**) y 5-FU. Se observaron deformaciones, desprendimientos, roturas y agregados debido a la actividad antibacteriana de estos compuestos. También se observó que el oro podría estar acumulándose en la pared celular de las bacterias provocando su muerte.

## ABSTRACT

For this final degree project several gold (I) complexes of the structure  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$  and  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_2]$  have been prepared. Different phosphine ligands ( $\text{PR}_3$ ) have been used: PTA (1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane), DAPTA (3,7-diacetyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane), TPPTS (tri(m-sulfonatedphenyl)phosphine), HMPT (tris(dimethylamino)phosphine) and  $\text{PPh}_3$  (triphenylphosphine) in addition to 5-FU (5-fluoracilo).

All the prepared compounds were characterized by different techniques:  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  and  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR, IR (ATR) and mass spectrometry. From the spectroscopic information obtained it was deduced that the complexes  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**),  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**),  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**),  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) and  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) were formed and characterized successfully.

Then, the pharmacokinetic profile of these compounds was evaluated. For this, their UV-vis absorption spectra were measured for 24 hours at 37 °C in phosphate buffered saline solution. Their  $^1\text{H}$  NMR spectra were also measured in the presence of NAC-ME (N-acetylcysteine methylester) at the time of its addition and after 24 hours. The complexes appeared to be stable with the conditions of the experiments.

The antibacterial activity of the complexes against the model bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* was also studied. For this, their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was measured using the broth dilution method as well as their Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by the resazurin method. The complexes were found to have high antibacterial activity, with MICs ranging from 256 to 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These complexes have a higher antibacterial activity against *B. subtilis* (Gram +) than against *E. coli* (Gram-) possibly due to their different conformation and composition of the cell wall.

Eventually, the external damage of the bacteria was visualized by means of scanning electron microscopy (SEM) at values close to or equal to the MIC of  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**),  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**) and 5-FU. In most of the cases, the cell wall was damaged in presence of the compounds since deformation and even leakage of cytoplasmatic content could be observed. It was also observed that gold might be overloading on the cell wall of bacteria causing their death.

## Lista de abreviaciones

<b>PTA</b>	1,3,5 triaza-7-fosfaadamantano
<b>DAPTA</b>	3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfacyclo[3.3.1]nonano
<b>PPh<sub>3</sub></b>	trifenilfosfina
<b>HMPT</b>	trisdimetilamino fosfano
<b>TPPTS</b>	m-trifenilfosfinatrisulfonada
<b>tht</b>	tetrahidrotiofeno
<b>Rdto</b>	rendimiento
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	dimetilsulfóxido deuterado
<b>IR</b>	espectroscopía infrarroja
<b>ATR</b>	reflectancia total atenuada
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>δ</b>	desplazamiento
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b>Hz</b>	hercio
<b>MHz</b>	megahercio
<b>s</b>	singlete
<b>d</b>	doblete
<b>dd</b>	doblete de doblete
<b>m</b>	multiplete
<b>nm</b>	nanómetros
<b>mmol</b>	milimol
<b>mM</b>	milimolar
<b>μL</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>g</b>	gramo
<b>mg</b>	miligramo
<b>PBS</b>	tampón fosfato salino
<b>RAM</b>	resistencia a los antimicrobianos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ECDC</b>	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>5-FU</b>	5-fluorouracilo
<b>UV-vis</b>	ultravioleta-visible
<b>NAC</b>	N-acetil-L-cisteína
<b>NAC-ME</b>	N-acetilcisteína metilester
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MALDI MS</b>	espectrometría de masas modo desorción/ionización láser asistida por matriz
<b>m/z</b>	relación masa/carga
<b>DCTB</b>	matriz de 1,1-Diciano-4-tert-butilphenil-3- metilbutadieno
<b>MIC</b>	concentración mínima inhibitoria
<b>MIC50</b>	MIC requerida para inhibir el crecimiento del 50% de los organismos

<b>MBC</b>	concentración mínima bactericida
<b>SEM</b>	microscopía electrónica de barrido
<b>SEM ECB</b>	microscopía electrónica de barrido modo detección electrones retrodispersados
<b>SEM SE</b>	microscopía electrónica de barrido modo detección electrones secundarios
<b>NB</b>	medio de cultivo <i>Nutrient broth</i>
<b>LB</b>	medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i>

## 1. Introducción

Muchos de los antibióticos que están actualmente en uso han disminuido su eficacia debido a la resistencia antimicrobiana (RAM). Las bacterias tienen una alta capacidad para desarrollar resistencia a los agentes antibacterianos mediante diferentes mecanismos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) han destacado la RAM como un problema mundial. Por ejemplo, en la actualidad hay una gran preocupación por la resistencia de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus* ante varios fármacos<sup>1,2</sup>. Otro ejemplo preocupante es la resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a los dos antituberculosos más potentes para la contención de una epidemia mundial de tuberculosis<sup>1</sup>. A este problema se suma un gran descenso en el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. En julio de 2019 había solo 42 candidatos a fármacos antibióticos en ensayos clínicos y gran parte de ellos son derivados de antibióticos ya conocidos con lo cual serán propensos a los mecanismos de resistencia existentes<sup>3</sup>.

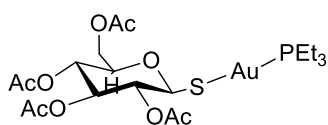
Una buena opción para el desarrollo de nuevos antimicrobianos es el uso de complejos metálicos. El interés por el uso de complejos metálicos como fármacos empezó hace 50 años con la aprobación del *cisplatino*,  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ <sup>4,5</sup>, que fue el primer complejo metálico en usarse clínicamente para el tratamiento del cáncer y que se sigue usando en la actualidad combinado con otros fármacos. Durante los últimos años se han investigado una gran variedad de complejos de metales nobles como candidatos para el desarrollo de nuevos posibles fármacos anticancerosos, antirreumáticos, antipalúdicos y antimicrobianos<sup>6</sup>. Aunque los mecanismos de la actividad antibacteriana aún no han sido profundamente estudiados, los compuestos antibacterianos de complejos metálicos parecen tener modos de acción novedosos y multimodales respecto los antibióticos convencionales proporcionando una gran ventaja para el tratamiento de infecciones bacterianas con resistencia a los antibióticos convencionales<sup>7,8</sup>.

La pared celular de las bacterias será la primera barrera que tengan que superar los agentes antibacterianos. Las bacterias presentan distintos mecanismos específicos para permitir la entrada de algunas biomoléculas necesarias para su supervivencia. Para fines antibacterianos, los metales pueden formar complejos con estas biomoléculas (o con antibióticos) de modo que estas actúen como llave para la entrada del metal a un área determinada de la bacteria y ejercer así su efecto antibacteriano. Los complejos metálicos que muestran la actividad antibacteriana más prometedora son aquellos de plata, oro, galio, cobre y manganeso<sup>7</sup>.

Centrándonos en el **oro**, sus estados de oxidación más importantes son +1 y +3. El oro(I) presenta una configuración electrónica de  $d^{10}$  y forma generalmente complejos con geometría lineal, aunque también puede formar complejos con geometría trigonal o tetragonal. El catión  $\text{Au}^+$  es grande y presenta un estado de oxidación bajo. El oro(I) es, por tanto, un ácido blando, de modo que tiene mayor tendencia a coordinarse con bases blandas, es decir, ligandos con átomos dadores blandos como tiolatos, tioéteres, cianuro, fosfinas o arsinas. Los complejos de oro(I) son estables en disolventes no acuosos apróticos pero en disolución acuosa tienen una alta tendencia a desproporcionar formando  $\text{Au(III)}$  y  $\text{Au(0)}$ . La naturaleza de los ligandos será esencial para favorecer la estabilidad del complejo en disolución acuosa.



Se conoce que en la China del año 2500 a. C. ya usaban el oro como uso médico, sin embargo, el primer hallazgo realmente científico sobre complejos de oro para uso farmacológico fue en 1890, cuando Robert Koch descubrió la gran capacidad antibacteriana del complejo de oro(III)  $K[Au(CN)_2]$  contra la *Mycobacterium tuberculosis*<sup>9</sup>. El interés del uso del oro para el desarrollo de posibles fármacos explotó en la década de los 30 tras el desarrollo de distintos complejos tiolato de oro(I) para el tratamiento a la artritis reumatoide<sup>10,11</sup>. Estos compuestos fueron los primeros fármacos de complejos de oro usados clínicamente y varios de ellos se usan actualmente. El más joven de ellos es el auranofin (**figura 1**), un complejo tipo tiolato-trietilfosfina de oro(I), que fue aprobado en 1985 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés)<sup>2</sup>. Más adelante se estudió el auranofin como un potencial agente para una serie de enfermedades humanas como el



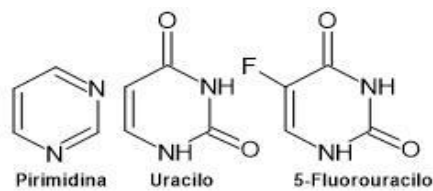
**Figura 1.** Estructura del auranofin

cáncer, trastornos neurodegenerativos, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y enfermedades infecciosas<sup>13</sup>. La obtención de resultados fructuosos ha disparado el interés en la investigación de nuevos complejos de oro(I) y oro(III) como potenciales agentes anticancerígenos<sup>6,14,15</sup> y, aunque en menor medida, como antimicrobianos<sup>3,9,16</sup>.

Vistas las últimas investigaciones sobre los complejos de oro(I) como posibles agentes antibacterianos, la mayoría de los compuestos publicados presentan ligandos fosfinas o ligandos tipo carbeno N-heterocíclico (NHC)<sup>7</sup>. El uso de este tipo de ligandos se debe a que favorecen considerablemente la estabilización del oro(I). En general, un importante número de este tipo de compuestos ha demostrado presentar una actividad antibacteriana relevante<sup>9</sup>.

Recientemente se han estudiado las propiedades antibacterianas de complejos de oro(I) tipo  $[Au(L)(PPh_3)]^{17}$ . Para ello, los autores usaron cloro(trifenilfosfina)oro(I) ( $[AuCl(PPh_3)]$ ) como precursor. La estabilidad del fragmento  $\{Au(PPh_3)\}^+$  permite sustituir el cloruro por el ligando (L) deseado. Los ligandos (L) usados se trataban principalmente de S-dadores o N-dadores, entre ellos, sulfonamidas y benzotiazoles.

A la hora de diseñar un posible fármaco basado en metales, se puede elegir como ligando de coordinación una molécula que ya sea activa por sí sola, de modo que su combinación con el metal pueda incluso incrementar la actividad biológica final. A este respecto, la molécula de **5-fluoroacilo** (5-FU), un fármaco usado para tratar distintos tipos de cáncer, ha demostrado presentar actividad antibacteriana frente a distintas especies de bacterias<sup>18,19</sup>. Por ejemplo, presenta una  $MIC_{50} \leq 0.8 \mu g/mL$  frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Su actividad anticancerígena fue descubierta en 1957 por Heidelberg *et al.*<sup>20</sup> y fue patentado en 1962<sup>21</sup>. Se trata de un derivado del uracilo, una de las bases nitrogenadas con estructura de pirimidina que conforman el ARN. La única diferencia entre el 5-FU y el uracilo es la presencia de un átomo de flúor en el carbono 5 en lugar de un átomo de hidrógeno, como se observa en la **figura 2**.



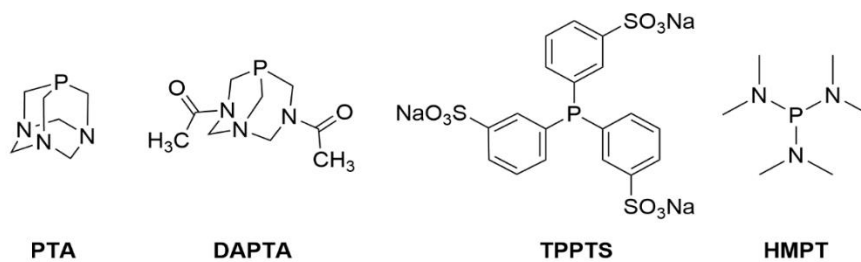
**Figura 2.** Estructura química de la pirimidina y dos de sus

El 5-FU es un antimetabolito, es decir, una sustancia con una estructura similar a un metabolito que inhibe una determinada función celular. El 5-FU podrá entrar a la célula a través del mismo mecanismo de transporte que el uracilo. Su mecanismo de acción implica la inhibición irreversible de la timidilato sintasa, una enzima clave para la producción de ADN y la incorporación en el ADN y ARN<sup>22</sup>. Aunque hay diversos estudios acerca de la interacción del 5-FU o sus derivados con diferentes metales, solo se han descrito en la bibliografía dos complejos de oro coordinados a derivados del 5-FU<sup>23</sup>. Previamente, la doctora Elena Atrián sintetizó y caracterizó nuevos complejos de oro(I) que presentaban como ligandos el 5-FU y PTA o DAPTA, que resultaron ser activos frente a células de cáncer de colon<sup>24</sup>.

## 2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El principal objetivo de este trabajo ha sido la síntesis de fosfino complejos de oro(I) con la molécula de 5-fluoracilo y su estudio como potenciales agentes bactericidas. . Para conseguir este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Síntesis y caracterización de distintos compuestos de oro (I) tipo  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$  o  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_2]$ . Para ello se emplearán como ligandos las fosfinas hidrosolubles PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), DAPTA (3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfabicyclo[3.3.1]nonano), TPPTS (trifenilfosfinatrisulfonada) y HMPT (trisdimetilamino fosfano) (**Figura 3**) y  $\text{PPh}_3$  (trifenilfosfina) como fosfina liposoluble. Para la caracterización de los compuestos se utilizarán distintas técnicas instrumentales como resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$ , espectroscopía de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas.



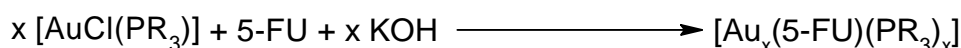
**Figura 3.** Estructura de las fosfinas hidrosolubles

- Estudios farmacocinéticos de los complejos obtenidos con el fin de evaluar su comportamiento en medio fisiológico.
- Medida de la actividad antibacteriana de los complejos obtenidos frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para ello se medirán sus concentraciones mínimas bactericidas (MBC, por sus siglas en inglés) y concentraciones para inhibir el crecimiento (MIC, por sus siglas en inglés).
- Observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de los cambios externos que puedan sufrir las bacterias en presencia de algunos de los compuestos obtenidos a concentraciones iguales o cercanas a la MIC.

### 3. Discusión y resultados

#### 3.1. Obtención de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$ y $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_2]$

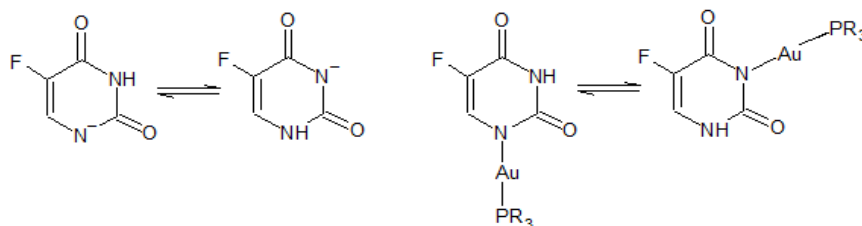
Como se recoge en el apartado anterior, el primer objetivo de este trabajo consiste en sintetizar una serie de complejos tipo fosfina de oro (I) en presencia de 5-FU como ligando. Para ello se utilizó como precursor inicial el complejo  $[\text{AuCl}(\text{tht})]^{25}$ . El tht (tetrahidrotiofeno) es un ligando lábil y es desplazado fácilmente por otros ligandos. En este caso es sustituido por ligandos tipo fosfina, que se caracterizan por formar enlaces estables con oro (I). El  $[\text{AuCl}(\text{tht})]$  ha demostrado ser un precursor muy útil para formar una gran variedad de complejos derivados de oro(I). En el caso de este trabajo esto no ha sido una excepción; las reacciones para obtener los complejos tipo  $[\text{AuCl}(\text{PR}_3)]$  a partir  $[\text{AuCl}(\text{tht})]$  han funcionado muy bien, con rendimientos entre 85 y 95%. Una vez obtenidos los complejos del tipo  $[\text{AuCl}(\text{PR}_3)]$ , mediante los procedimientos descritos en la sección experimental se sintetizaron los complejos tipo  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$  deseados. El patrón general de síntesis se ilustra en el **esquema 1**.



**Esquema 1.** Esquema simplificado para obtención de  $[\text{Au}_x(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_x]$ .  $\text{PR}_3 = \text{PTA}$ ,  $x = 1$  (**1**),  $x = 2$  (**2**);  $\text{PPh}_3$ ,  $x = 1$  (**3**);  $\text{TPPTS}$ ,  $x = 1$  (**4**);  $\text{DAPTA}$ ,  $x = 1$  (**5**);  $\text{HMPT}$   $x = 1$  (**6**)

Una de las primeras cuestiones que nos podemos preguntar es el sitio donde se coordina el oro con el 5-FU. La presencia de una base fuerte como KOH sirve para desprotonar los nitrógenos relativamente ácidos del 5-FU. El nitrógeno que posea la carga negativa será aquel que se coordine con el Au(I). Estudios previos parecen demostrar que el disolvente utilizado influye mucho en si la desprotonación sucede en el nitrógeno 1 (N1) o nitrógeno 3 (N3)<sup>26,27</sup>. Por ejemplo, en DMSO el 5-FU desprotona mayormente en N1 pero en  $\text{D}_2\text{O}$  parece que desprotona mayormente en N3. No obstante, siempre tendremos la presencia de los dos aniones aunque sean en distinta proporción. En el caso de este trabajo, se ha usado como disolvente MeOH que presenta una polaridad intermedia entre DMSO y agua de modo que puede ser esperable la coordinación del oro en las diferentes posiciones mencionadas. Análogamente, podrían considerarse posibles equilibrios donde el fragmento  $\text{AuPR}_3$  intercambia posición entre los dos nitrógenos. Dicho esto, siempre habrá que tener presente la posible existencia de estos equilibrios que se ilustran en la **figura 4**.

También se podría considerar la coordinación del 5-FU al oro mediante los átomos de oxígeno a partir de la forma tautomérica enólica. Sin embargo, el carácter duro de los oxígenos y la poca tendencia a formar la tautomería enólica por parte del 5-FU descartan completamente esta posibilidad.



**Figura 4.** Posibles equilibrios en disolución de 5-FU en medio alcalino y complejos  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PR}_3)]$

En las siguientes secciones se discutirá acerca de los resultados obtenidos para la caracterización de los compuestos sintetizados.

### 3.1.1. Síntesis de [Au(5-FU)(PTA)] (1) y [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (2)

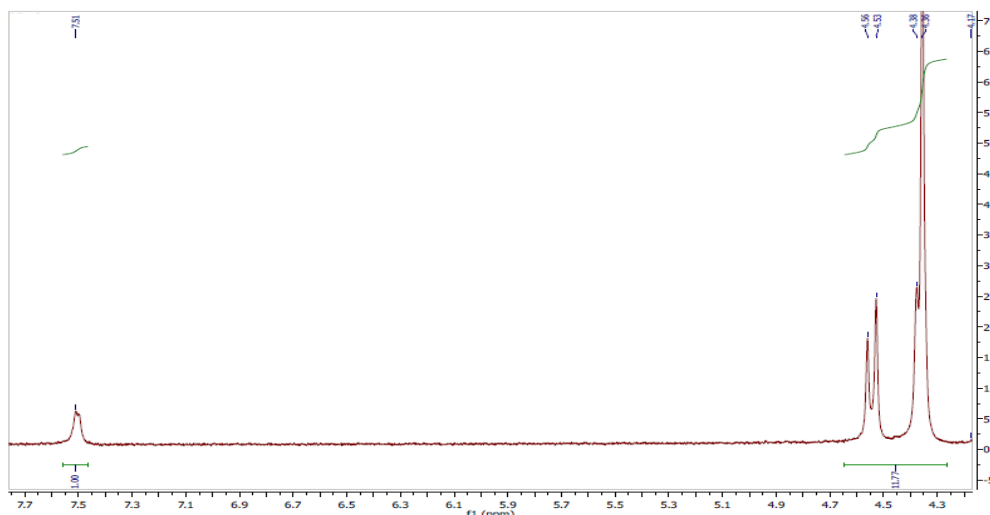
Se llevó a cabo la síntesis de [Au(5-FU)(PTA)] (1) y [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (2) mediante el procedimiento recogido en la parte experimental. Para el primer complejo se usó estequiometría 1:1:1 y para el segundo 1:2:2 (5-FU/KOH/[AuCl(PTA)]).

**Tabla 1.** Señales de RMN <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} y <sup>19</sup>F {<sup>1</sup>H} para 5-FU, [AuCl(PTA)]<sup>24</sup>, **1** y **2**. Para 5-FU, [AuCl(PTA)] y **1** en DMSO-d<sub>6</sub> como disolvente. Para **2** en D<sub>2</sub>O como disolvente.

	5-FU	NCH <sub>2</sub> N	NCH <sub>2</sub> P	<sup>19</sup> F { <sup>1</sup> H}	<sup>31</sup> P { <sup>1</sup> H}
5-FU	11.48 (brs) 10.79 (brs) 7.75 (d, J <sub>H-F</sub> =4Hz)			-171.40	
[AuCl(PTA)]		4.51 y 4.36 (sistema AB)	4.34 (s)		-51.9
<b>1</b>	7.51 (s)	4.53 y 4.38 (sistema AB)	4.36 (s)	-169.40	-55.61
<b>2</b>	7.48 (s)	4.52 y 4.43 (sistema AB)	4.26 (s)	-169.89	-51.96 y -51.46 (0.5/1)

Para el caso de [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) se observa la señal del hidrógeno en posición 6 del 5-FU (**Figura 5**). En el 5-FU esta señal aparece a 7.75 ppm como un doblete debido al acoplamiento con el átomo de flúor. Cuando el 5-FU se coordina con el oro este acoplamiento ya no se observándose en su contra un singlete. También se observa un ligero apantallamiento de estas señales al coordinarse con el oro: de 7.75 ppm a valores alrededor de 7.50 ppm. El desplazamiento de esta señal sirve para confirmar que el 5-FU se ha desprotonado y en consecuencia la posible coordinación con el oro. Los espectros <sup>19</sup>F {<sup>1</sup>H} dan señales en torno a los -169 ppm confirmando la presencia del 5-FU en el complejo.

Respecto a los hidrógenos de las fosfinas se observa un sistema AB que pertenece a los hidrógenos NCH<sub>2</sub>N y un singlete que corresponden a los hidrógenos NCH<sub>2</sub>P análogo al observado para el caso de [AuCl(PTA)]. La integración de los hidrógenos es clave también para diferenciar entre [Au(5-FU)(PTA)] o [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>]. En el caso del complejo **1**, los protones de las fosfinas integran con una relación 12:1 respecto el protón de la posición 6 del 5-FU. Esto confirma que solo se ha coordinado un fragmento Au-fosfina. Para el caso de [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**) no se observa ninguna señal correspondiente a los N-H del 5-FU implicando la posible formación del dianión del 5-FU y en consecuencia la coordinación de dos fragmentos Au-fosfina. Se observan además dos señales en <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} que refuerzan el argumento de la incorporación de dos unidades {Au(PTA)}, aunque hay que ser prudente debido a los posibles equilibrios ya comentados. La coordinación de los dos fragmentos Au-fosfina se confirma con la integración de los protones de las fosfinas como 1:24 respecto el protón de la posición 6 del 5-FU. Por otro lado, la aparición de la señal del <sup>19</sup>F {<sup>1</sup>H} confirma también la presencia del 5-FU.



**Figura 5.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) en  $\text{DMSO-d}_6$ .

Si comparamos el espectro IR del complejo **1** frente al **2** se observan claras diferencias. Las señales más destacables y fiables son las del carbonilo  $\text{C}=\text{O}$ : el espectro IR del 5-FU presenta una banda intensa a  $1645\text{ cm}^{-1}$  y otra más débil a  $1720\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los carbonilos. El complejo  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) presenta estas bandas a  $1583$  y  $1695\text{ cm}^{-1}$  y en el compuesto  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**) las bandas carbonilo aparecen a  $1535$  y  $1557\text{ cm}^{-1}$ . Parece ser que al aumentar el número de fragmentos Au-fosfina coordinados al 5-FU las bandas de los carbonilos aparecen a menores frecuencias. Esto significa que el enlace doble  $\text{C}=\text{O}$  adquiere un mayor carácter de enlace simple posiblemente porque hay una cesión de densidad eléctrica del enlace doble a los átomos de nitrógeno cuando estos están coordinados al oro.

A través de los datos espectroscópicos, los complejos  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) y  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**) se han obtenido exitosamente. No ha sido posible obtener información adicional en la espectrometría de masas.

### 3.1.2. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$ (**3**)

Se llevaron a cabo las mismas reacciones descritas en el apartado anterior con  $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$  en lugar de  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  mediante el procedimiento descrito en la sección experimental, es decir usando las estequiometrías 1:1:1 y 1:2:2 (5-FU/KOH/ $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ ). Los resultados espectroscópicos se presentan en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Señales de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  para 5-FU,  $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$ <sup>28,29</sup> y **3**.

	5-FU	H-Ar	$^{19}\text{F}$ $\{^1\text{H}\}$	$^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$
5-FU	11.48 (brs) 10.79 (brs) 7.75 (d, $J_{\text{FH}}=4\text{Hz}$ )		-171.40	
$[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$		7.55 (m) (en $\text{CDCl}_3$ )		-33.31 (en $\text{DMSO-d}_6$ )
<b>3</b>		7.61 (m)	-169.41	-31.62

Tanto para la relación estequiometría 1:1:1 como 1:2:2, se obtuvo un sólido cuyos análisis espectroscópicos encajan para la misma fórmula  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**), es decir, no se consigue la coordinación de las dos unidades  $\{\text{AuPPh}_3\}$ . En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN no es posible diferenciar la señal correspondiente al hidrógeno de la posición 6 del 5-FU porque su señal se solapa con la de los hidrógenos aromáticos pertenecientes a la trifenilfosfina. A pesar de ello, se puede ratificar la presencia del 5-FU por la aparición de las correspondientes señales de  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$ . En los espectros de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  RMN para estequiometría 1:1:1 y 1:2:2 se ha obtenido una sola señal y por tanto se deduce que solo se ha coordinado un fragmento Au-fosfina ya que en caso contrario se esperarían dos señales debidas al distinto entorno químico de los átomos de fósforo. La gran similitud entre los espectros IR de los sólidos obtenidos en ambas reacciones sirve para apoyar la teoría de que son el mismo complejo:  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$ . En el espectro IR se observan las bandas a 1628 y 1588  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los carbonilos. También aparece una banda a 437  $\text{cm}^{-1}$  que puede corresponderse al enlace Au-N. Como ocurría en la sección anterior, las señales de los carbonilos aparecen a menores valores reforzando el hecho de que el 5-FU efectivamente está coordinado al oro.

La imposibilidad de conseguir el complejo  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)_2]$  puede explicarse por los factores estéricos. Véase que la trifenilfosfina es un ligando muy voluminoso poseyendo un ángulo cónico de 145°. Por el contrario, la PTA es un ligando mucho más pequeño con un ángulo cónico de 103°<sup>30</sup>. No ha sido posible obtener información adicional en la espectrometría de masas.

### 3.1.3. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$ (**4**)

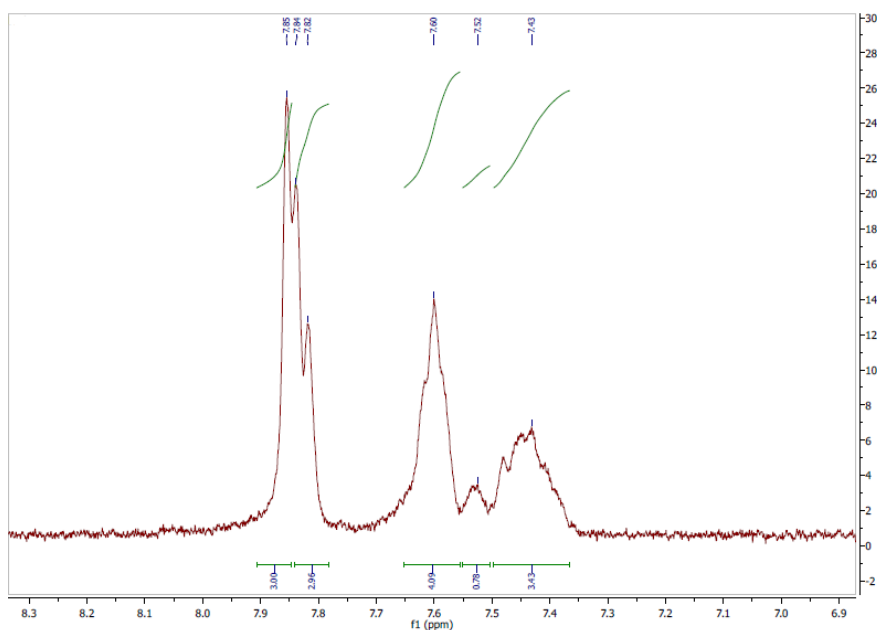
Se llevó a cabo la síntesis de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) mediante el procedimiento descrito en la sección experimental. Para este caso no se intentó obtener  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{TPPTS})_2]$  ya que con trifenilfosfina no fue posible y el TPPTS es un ligando similar, incluso más voluminoso. Los resultados espectroscópicos se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 3.** Señales de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  en DMSO- $d_6$  para 5-FU,  $[\text{AuCl}(\text{TPPTS})]$  y **4**.

	5-FU	H-Ar	$^{19}\text{F}$ $\{^1\text{H}\}$	$^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$
5-FU	11.48 (brs) 10.79 (brs) 7.75 (d, $J_{\text{FH}}=4\text{Hz}$ )		-171.40	
$[\text{AuCl}(\text{TPPTS})]$		7.85 (m, 6H) 7.60 (td, $J=8\text{ Hz}, 4\text{Hz}, 3\text{H}$ ) 7.40 (dd, $J=12\text{Hz}, 8\text{ Hz}, 3\text{H}$ )		-34.01
<b>4</b>	7.52 (s, 1H)	7.85 (s, 3H) 7.83 (d, $J=8\text{Hz}, 3\text{H}$ ) 7.60 (m, 3H) 7.43 (m, 3H)	-169.57	-32.32

Al igual que en las secciones anteriores se observa que en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **4**, la señal del hidrógeno de la posición 6 del 5-FU desplazada a campo alto con respecto al 5-FU libre (**figura 6**). Además, esta señal ya no aparece como doblete sino como singlete, como ocurría con  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) y  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$  (**2**). Tampoco se observa la señal N-H del 5-FU. A partir del patrón de señales obtenidas en  $[\text{AuCl}(\text{TPPTS})]$  se ha podido diferenciar la señal del hidrógeno del 5-FU con las demás. Los protones aromáticos integran

1:12 respecto al del 5-FU y por tanto solo se ha coordinado un fragmento Au-fosfina al 5-FU. Este hecho se corrobora con la existencia de una sola señal en el espectro de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN. Aparece también la señal correspondiente al 5-FU en el espectro de  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ . No ha sido posible obtener más información mediante la espectrometría de masas. En el espectro IR aparecen dos bandas a  $1599$  y  $1651\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los carbonilos del 5-FU. De nuevo se pone en evidencia que cuando el oro se coordina al 5-FU las señales de los carbonilos aparecen a menores frecuencias.



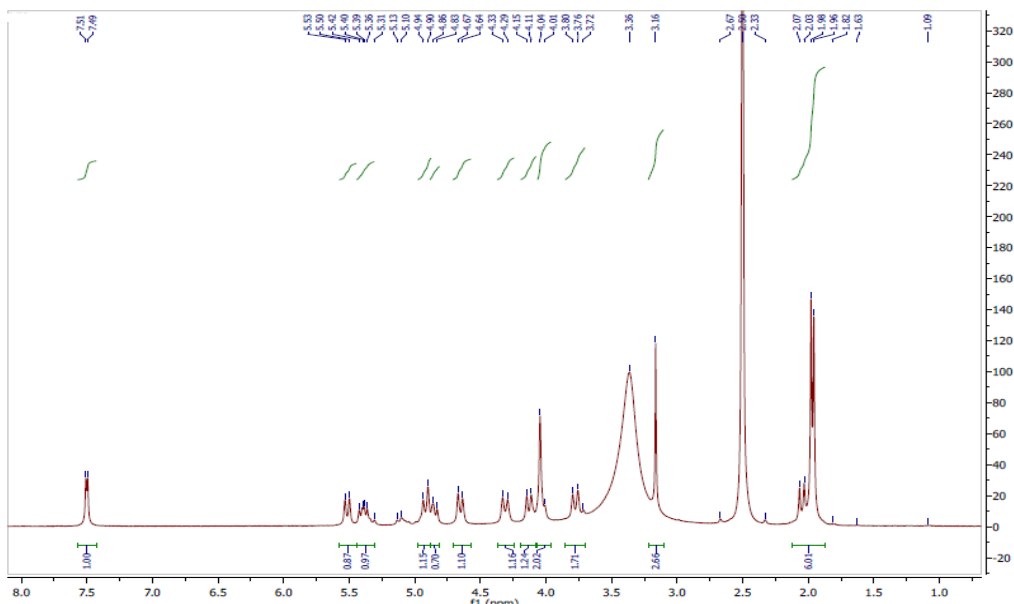
**Figura 6.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) en  $\text{DMSO-d}_6$ .

### 3.1.4. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$ (**5**)

Se llevó a cabo la síntesis de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) mediante el procedimiento descrito en la sección experimental. No se intentó obtener  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{DAPTA})_2]$  debido al trabajo realizado anteriormente por Atrián, E. donde ya se intentó su obtención sin resultados<sup>24</sup>. Este hecho también fue explicado mediante factores estéricos. En la **tabla 4** se ilustran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.** Señales de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  para 5-FU,  $[\text{AuCl}(\text{DAPTA})]$  y **5**.

	5-FU	N-CH <sub>2</sub> -N	N-CH <sub>2</sub> -P	CH <sub>3</sub>	$^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$
5-FU	11.48 (brs) 10.79 (brs) 7.75 (d, $J_{\text{HF}}=4\text{Hz}$ )				-171.40	
$[\text{AuCl}(\text{DAPTA})]$		5.50(d) 4.87(d) 4.62(d) 4.10(d)	5.38 (dd) 4.87 (dd) 4.30 (d) 4.26 (dt) 3.76 (d)	1.96 (s) 1.95 (s)		-27.0
<b>5</b>	7.50(d, $^3J_{\text{HF}}=8\text{Hz}$ , 1H)	5.52(d) 1H 4.92 (d) 1H 4.66(d) 1H 4.13(d) 1H	5.40 (dd) 1H 4.85(d) 1H 4.31 (d) 1H 4.04 (s) 2H 3.78 (d) 1H	1.98 (s) 3H 1.96 (s) 3H	-169.86	-29.76



**Figura 7.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) en  $\text{DMSO-d}_6$ .

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa la misma tendencia respecto al hidrógeno de la posición 6 del 5-FU que en anteriores secciones (**figura 7**). En este caso se observa el acoplamiento con el átomo de flúor viéndose como un doblete. Las señales de los hidrógenos han sido asignadas a  $\text{NCH}_2\text{N}$  o  $\text{NCH}_2\text{P}$  mediante comparación y apoyo bibliográfico<sup>24</sup> ya que se necesitan espectros bidimensionales para su completa asignación. Las señales de los  $\text{CH}_3$  aparecen a diferentes desplazamientos debidos a pérdidas de la simetría del DAPTA. Los hidrógenos en **5** aparecen ligeramente más desapantallados que los de  $[\text{AuCl}(\text{DAPTA})]$ . La presencia de 5-FU se confirma con la señal obtenida del  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$ . A partir de las integraciones del espectro de  $^1\text{H}$  se deduce que solo se une un fragmento Au-fosfina al 5-FU. Esto se corrobora con la obtención de una sola señal en el espectro de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$ .

En el espectro IR se observan las bandas de los carbonilos a  $1588$  y  $1619\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las del 5-FU. Probablemente la tercera banda correspondiente a los carbonilos del DAPTA esté oculta entre las anteriores. Se observa de nuevo que las bandas del carbonilo del 5-FU aparecen a menores valores cuando está coordinado al oro que como 5-FU libre. No se obtuvo ninguna información adicional con los espectros de masas.

### 3.1.5. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{HMPT})]$ (**6**)

Al emplear  $[\text{AuCl}(\text{HMPT})]$  como producto de partida tras la desprotonación de la molécula de 5-FU obtuvimos similares resultados independientemente de la estequiometría 1:1:1 ó 1:2:2 (5-FU/ $\text{KOH}/[\text{AuCl}(\text{HMPT})]$ ). Los resultados espectroscópicos se presentan en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Señales de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  para 5-FU,  $[\text{AuCl}(\text{HMPT})]$  y **6**.

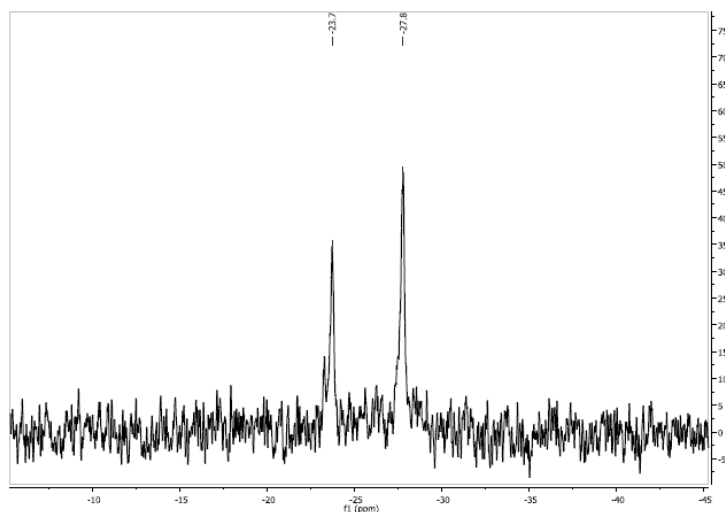
	5-FU	N- $\text{CH}_3$	$^{19}\text{F}$ $\{^1\text{H}\}$	$^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$
5-FU	11.48 (brs) 10.79 (brs) 7.75 (d, $J_{\text{FH}}=4\text{Hz}$ )		-171.40	
$[\text{AuCl}(\text{HMPT})]$		2.62 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 12\text{Hz}$ )		-109.73
<b>6</b>	7.39 (s, 1H)	2.64 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 12\text{Hz}, 18\text{H}$ )	-173.75	-114.00 y -111.56 (1:0.6)



En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observa la señal del hidrógeno de la posición 6 del 5-FU de la misma forma que en las secciones anteriores. Para este compuesto tampoco se observa ningún N-H del 5-FU. También se observa la señal del espectro  $^{19}\text{F} \{^1\text{H}\}$  correspondiente al 5-FU. La señal de los hidrógenos de la fosfina es un doblete porque se acopla con el fósforo centrado en 2,64 ppm, ligeramente más desapantallado con respecto al producto de partida e integrando por 18H para ambas estequiometrias, lo que implica que solo se ha coordinado una unidad Au-fosfina.

En los espectros de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  RMN se observan dos señales, a pesar de que se ha coordinado una unidad Au-HMPT. Estas señales resultan confusas y no permiten respaldar la explicación de las integraciones obtenidas en los espectros de  $^1\text{H}$ , si se compara con el resto de los derivados descritos. Sin embargo, teniendo en cuenta la posibilidad de una desprotonación simultánea de los dos grupos NH del 5-FU, puedan coexistir ambas especies en disolución estableciéndose así un equilibrio. En ese caso, podría observarse una sola señal de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  a temperatura ambiente o podrían detectarse ambas especies a temperatura ambiente.

De hecho, en el caso del complejo  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) que es soluble en MeOD, se midió un espectro de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  RMN a baja temperatura (213 K) observándose el desdoblamiento de la señal que aparecería a temperatura ambiente en dos singletes a -23.7 y -27.8 ppm, que estaría de acuerdo con la idea de la presencia de ambas especies en equilibrio al desprotonarse los dos NH del 5-FU<sup>24</sup>. Dada la insolubilidad del resto de complejos sintetizados en MeOD, no pudieron medirse los demás espectros a baja temperatura para corroborar la hipótesis del equilibrio en el resto de derivados.



**Figura 8.** RMN  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  en MeOD a 213K<sup>24</sup>.

## 3.2. Ensayos de estabilidad

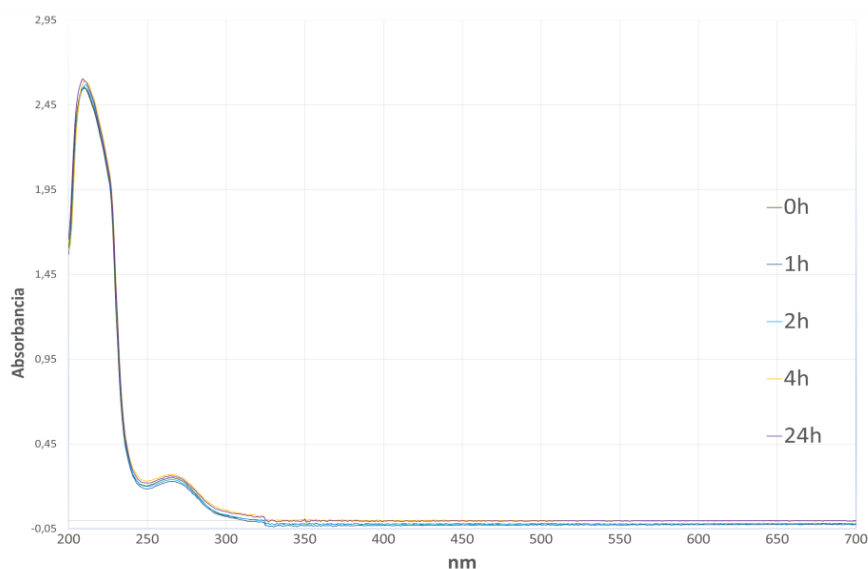
### 3.2.1. Medida de estabilidad mediante absorción UV-vis

En este ensayo se ha estudiado la estabilidad en disolución de los complejos **1**, **2**, **3**, **4** y **5** en condiciones fisiológicas. Para ello se midieron sus espectros de absorción UV-vis durante 24 horas a 37 °C después de disolverlos en PBS (*phosphate saline buffer*). El PBS es una disolución acuosa salina que simula el pH y la concentración de los iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del líquido extracelular, es decir, mantiene el pH a 7.4 mediante un tampón fosfato y presenta la misma

osmolaridad. Este ensayo es por tanto muy utilizado cuando se estudian compuestos como candidatos a fármacos. En el caso de encontrar que el compuesto no sea estable en medio fisiológico no significaría que este deba ser descartado ya que podría tratarse de un posible pro-fármaco. Un pro-fármaco es un compuesto cuya forma activa se genera dentro del organismo mediante un proceso químico o enzimático.

Todos los espectros de absorción UV-vis de los complejos medidos presentan el mismo patrón. La banda intensa encontrada cerca de los 210 nm probablemente se deba a una transición electrónica desde el ligando tipo fosfina al centro metálico (transición de transferencia de carga ligando-metal). La banda más débil encontrada en el rango de 250-300 nm está probablemente asociada a transiciones tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los ligandos (transición ligando-ligando), seguramente debido al carácter aromático del 5-FU.

Como se puede ver en la **figura 9** y en los **anexos (A40-A45)**, no se observan cambios apreciables ni en la forma ni en el desplazamiento de los máximos de los espectros de ningún compuesto durante las 24 horas. Además, es importante destacar la ausencia de aparición bandas de absorción alrededor de los 500 nm porque están relacionadas con la reducción de oro(I) a oro(0) y la toxicidad de muchos compuestos de oro se debe precisamente a la acumulación de oro(0). Esto implica que las fosfinas utilizadas parecen estabilizar satisfactoriamente el oro(I) en medio acuoso.

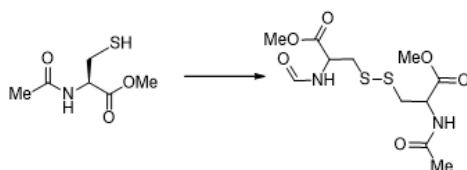


**Figura 9.** Medidas de estabilidad en UV-vis (Absorción vs longitud de onda) de **5**.

### 3.2.2. Medida de estabilidad en presencia de NAC-ME con RMN

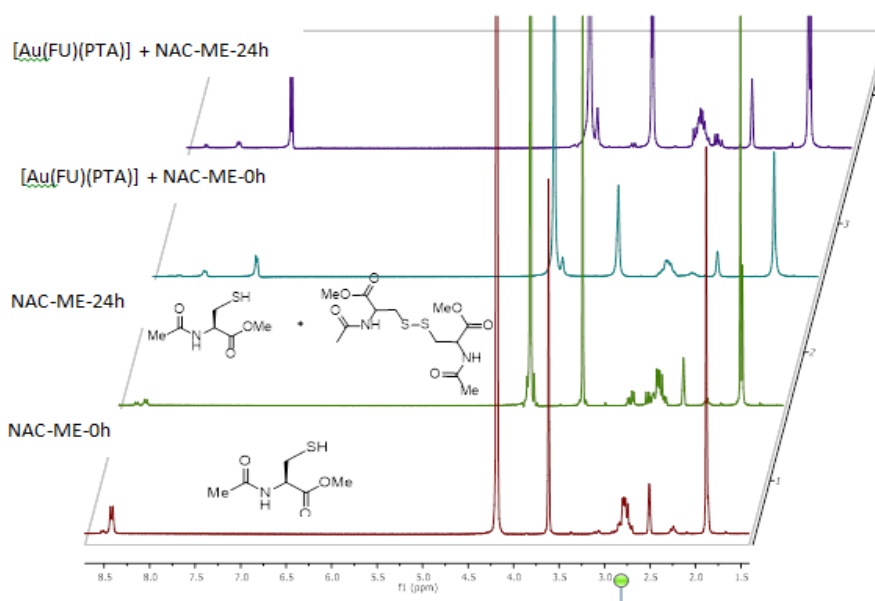
Se ha estudiado la reactividad de los complejos frente a nucleófilos modelo tal como N-acetilcisteína metilester (NAC-ME). La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un aminoácido derivado de la L-cisteína con un grupo acetil unido al grupo amino. Se trata de un pro-fármaco de cisteína que se usa como agente mucolítico y para el tratamiento de numerosos trastornos<sup>31</sup>. Por otro lado, la N-acetil-L-cisteína metil éster (NAC-ME) es la forma metilada de la NAC. El estudio de la estabilidad de una molécula como NAC-ME frente a complejos de oro no es trivial. Un motivo se debe a la cierta facilidad que tienen estos derivados en oxidarse formando dímeros mediante un puente disulfuro; esta oxidación podría implicar una reducción del oro (I) a oro

(0). Mediante la formación de estos puentes disulfuro, la L-cisteína juega un papel estructural muy importante en la conformación tridimensional de muchas proteínas.



**Figura 10.** Dimerización de NAC-ME tras la formación de un puente disulfuro.

Otro motivo para estudiar el comportamiento de la NAC-ME con los complejos sintetizados es por la conocida afinidad que tiene el oro (I) con ligandos tipo tiol. Puede existir la posibilidad entonces de que haya algún desplazamiento e intercambio de ligandos. Se han medido los espectros  $^1\text{H}$  RMN de los compuestos **1**, **3**, **4** y **5** en presencia de cantidades equimolares de NAC-ME en una mezcla  $\text{DMSO-}d_6$ : $\text{D}_2\text{O}$  (80:20) a lo largo del tiempo. La estabilidad de NAC-ME también se analiza con el tiempo, observándose que experimenta una auto oxidación tras 24h, de modo que aparecen nuevas señales en torno a 3, 1,8 y 4,4 ppm. En ninguno de los complejos ensayados (**figura 11** y **anexos A48-A51**) se observan señales nuevas consecuencia de la aparición de nuevas especies debido al intercambio de ligandos, por lo que los complejos aparentemente son inertes a la interacción con NAC-ME.



**Figura 11.** Estudio por RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) y N-acetilcisteína metilester (NAC-ME) a lo largo del tiempo.

### 3.3. Medidas de la actividad antibacteriana

Para determinar la actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados, se midieron las correspondientes concentraciones mínimas bactericidas (MBC, por sus siglas en inglés) y para inhibir el crecimiento (MIC, por sus siglas en inglés) de los compuestos **5-FU**, **1**, **2**, **3**, **4** y **5** contra *Escherichia coli* (Gram-) y *Bacillus subtilis* (Gram+) mediante los procedimientos descritos en la parte experimental.

La MIC (*minimal inhibitory concentration*) es la concentración más baja requerida para que un compuesto inhiba el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación durante una noche. El método que se ha usado para su determinación se denomina *broth dilution method*. La MIC es la medida más básica para medir la actividad de un agente antimicrobiano contra un microorganismo. Por otro lado, la MBC (*minimal bactericidal concentration*) se define como la concentración más baja requerida de un agente antimicrobiano para matar la mayoría (99.99%) de los microorganismos tras una noche de incubación. La MBC se midió mediante el ensayo con resazurina, descrito en la parte experimental.

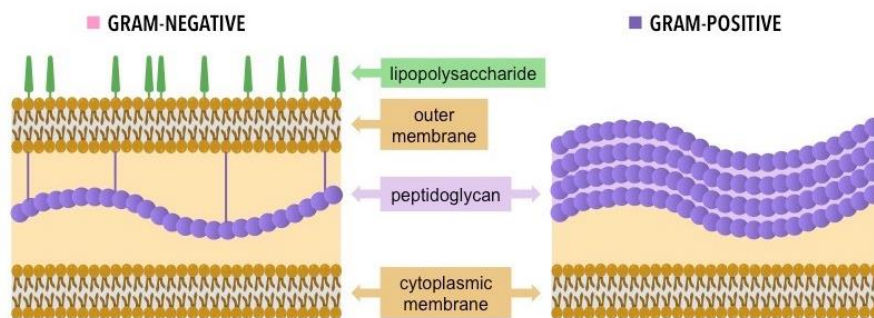
Los resultados obtenidos se representan en la **tabla 6**. Se realizaron ensayos en blanco en presencia de DMSO para asegurar que la muerte o inhibición del crecimiento de las bacterias se deba a los compuestos y no al disolvente. Este control confirmó que efectivamente el DMSO no afecta de al crecimiento de las bacterias.

**Tabla 6.** Valores de MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ), MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) y ratios MBC/MIC de los compuestos **5-FU**, **1**, **2**, **3**, **4** y **5** frente a *E. coli* y *B. subtilis*.

Compuesto	<i>Escherichia coli</i>			<i>Bacillus subtilis</i>		
	MIC	MBC	Ratio MBC/MIC	MIC	MBC	Ratio MBC/MIC
<b>5-FU</b>	1024	>1024	-	64	128	2
<b>1</b>	32	64	2	8	16	2
<b>2</b>	128	128	1	2	4	2
<b>3</b>	>1024	>1024	-	1	1	1
<b>4</b>	256	512	2	64	128	2
<b>5</b>	64	128	2	16	32	2

La primera cuestión que nos encontramos es en las diferencias de actividad entre las dos cepas estudiadas. *E. coli* es una bacteria Gram-negativa mientras que *B. subtilis* es Gram-positiva. La diferencia entre estos dos tipos de bacterias reside en la composición y conformación de su pared celular. La pared de las bacterias Gram+ está formada por una sola membrana lipídica citoplasmática cubierta por un número elevado de capas de peptidoglicano (entre 100 a 50), un polímero formado por azúcares y aminoácidos. Las bacterias Gram- presentan una membrana lipídica interna, una fina capa de peptidoglicano y una segunda membrana plasmática externa rica en porinas. La porina es una proteína transmembrana que forma poros que permiten la entrada y salida de moléculas pequeñas e hidrofílicas. Esta membrana externa limita en gran medida el paso de los compuestos.

En general, los resultados obtenidos nos muestran que los compuestos sintetizados presentan una mayor actividad frente a *Bacillus subtilis* que frente a *Escherichia coli*. Este hecho probablemente se deba a las diferencias comentadas en el párrafo anterior. Este aspecto está apoyado por la bibliografía ya que generalmente la mayoría de complejos metálicos presentan una menor, incluso escasa o nula actividad contra las bacterias Gram-negativas respecto las Gram-positivas<sup>3</sup>.



**Figura 12.** Conformación de la pared celular en bacterias Gram- y Gram+.

Otro aspecto a destacar es la mejoría de las propiedades antibacterianas cuando hay presencia de oro (I) frente al uso de solo 5-FU. Por ejemplo, con la excepción del compuesto  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**), todos los complejos de oro estudiados presentan una notable actividad antibacteriana frente a *E. coli*, mejorando en gran medida la actividad del 5-FU, para el que no se llegó a encontrar sus valores MIC y MBC. En el caso del estudio frente a *B. subtilis*, todos los complejos estudiados, excepto  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**), mejoran la actividad del 5-FU con MICs entre 4 y 64 veces menores que la del 5-FU. Así, se confirma que la presencia del centro metálico mejora la actividad antimicrobiana cuando comparamos los valores del 5-FU frente a los demás compuestos. Aunque los mecanismos de acción de los complejos de oro(I) no han sido profundamente estudiados en este trabajo, podría relacionarse con la gran afinidad que tiene el oro con algunas partes de proteínas como los tioles o selenoles<sup>32</sup>.

Además, se puede intentar explicar, aunque con precaución, las diferencias de actividad antibacteriana obtenidas para las diferentes cepas de bacterias según el tamaño e hidrofobicidad de las moléculas. En el caso de *E. coli*, tanto el 5-FU como  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**), ambos con un mayor carácter hidrofóbico, dieron menores actividades antibacterianas. El resto de los compuestos presentaron mayores actividades antibacterianas y resultan ser bastante más hidrofílicos. La vía para acceder dentro de las bacterias Gram-negativas es a través de las porinas. Las porinas solo dejan pasar a moléculas pequeñas e hidrofílicas. Si las moléculas son lipofílicas no podrán pasar a través de las porinas y atravesarán con dificultad la membrana externa de las Gram-negativas. El hecho de que  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) presente menor actividad contra *E. coli* que  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) a pesar de ser una molécula más hidrófila implica que, aunque esta propiedad parece ser muy importante, hay otros factores que afectan. Uno de ellos puede ser el tamaño de la molécula: por ejemplo, el compuesto  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) aunque sea más hidrófilo que  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) presenta un mayor peso molecular y es bastante más voluminoso dificultando el paso a través de las porinas.

En el caso de *B. subtilis* parece ocurrir lo contrario. El compuesto  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**), que es el menos soluble en agua y por tanto el más lipofílico, es el que muestra remarcablemente una mayor actividad. Por otro lado los compuestos menos lipofílicos como  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$  (**5**) y  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) son los que tienen menor actividad. Es interesante comparar la actividad de los complejos  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$  (**3**) y  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$  (**4**) ya que son moléculas con una estructura muy parecida con la única diferencia de la presencia de grupos sulfónicos en los anillos aromáticos para aumentar su solubilidad en agua en el complejo (**4**). Parece ser que el cambio del carácter lipofílico de (**3**) al carácter hidrofílico de (**4**) pueda ser la causa de que este último presente una MIC frente a *B. subtilis* 64 veces superior que (**3**). Una similar interpretación podríamos hacer mediante la comparación de  $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$  (**1**) y  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})]$

FU)(PTA)<sub>2</sub>] (2). Véase que al añadir un fragmento Au-PTA más estamos aumentando el carácter lipofílico de la molécula y que, a pesar de que estamos aumentando el tamaño de la molécula, esta diferencia parece ser importante para la actividad antibacteriana.

**Tabla 7.** Solubilidad en agua en molar de distintas fosfinas y del 5-FU.

<i>Solubilidad en agua (M)</i>	
<b>DAPTA</b>	7.4 <sup>30</sup>
<b>TPPTS</b>	1.94 <sup>30</sup>
<b>PTA</b>	1.5 <sup>30</sup>
<b>5-FU</b>	0.09 <sup>33</sup>
<b>PPh<sub>3</sub></b>	Insoluble <sup>34</sup>

Según los resultados obtenidos, el compuesto que podríamos considerar de mayor espectro sería el [Au(5-FU)(PTA)] (1) porque muestra buena actividad antibacteriana frente a ambas bacterias. Aunque en menor medida, también podríamos decir lo mismo para [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (2). Por el contrario, el compuesto que presenta una actividad bacteriana más selectiva es el [Au(5-FU)(PPh<sub>3</sub>)] (3) ya que tiene la mayor actividad para *B. subtilis* (MIC = 1 µg/mL) y, sin embargo, la menor para *E. coli* (MIC > 1024 µg/mL).

Se ha calculado la ratio MBC/MIC para establecer si los compuestos son bacteriostáticos o bactericidas. Un compuesto bacteriostático es aquel que inhibe el crecimiento de un microorganismo mientras que un compuesto bactericida es aquel que causa la muerte de los microorganismos. Por definición, se considera que un compuesto es bacteriostático cuando la ratio MBC/MIC es mayor a 4 o bactericida cuando la ratio MBC/MIC sea menor o igual a 4. En todos los casos donde se ha podido calcular la ratio MBC/MIC, estas han resultado ser menor a 4 y por tanto los compuestos **5-FU**, **1**, **2**, **3**, **4** y **5** se consideran como bactericidas para *B. subtilis* y los compuestos **1**, **2**, **4** y **5** son bactericidas para *E. coli*.

Por regla general se han obtenido unos resultados satisfactorios que animan a seguir con el estudio de este tipo de complejos para el desarrollo de nuevos posibles fármacos antibacterianos.

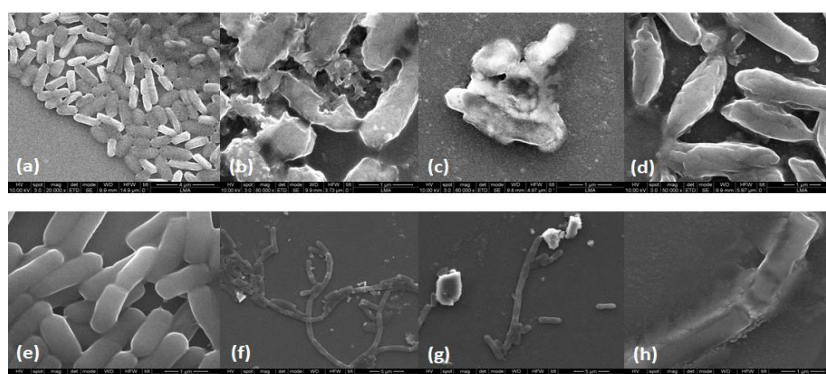
### 3.4. Visualización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Una de las muchas aplicaciones que guarda este tipo de microscopía es la visualización de la apariencia externa de las bacterias a una alta resolución y por tanto pudiendo observar los posibles efectos en su morfología en presencia de un agente antimicrobiano. En este caso se ha estudiado por SEM la morfología de ambas bacterias *B. subtilis* y *E. coli* incubadas en presencia de **5-FU**, [Au(5-FU)(PTA)] (1) y [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (2).

Existen varios modos de SEM pero los más utilizados son el modo (EEB), que detecta electrones retrodispersados y el modo (SE), que detecta electrones secundarios. Estos son los modos que se han utilizado en este trabajo. Los modos EEB y SE nos proporcionan distintos tipos de información. Las imágenes en modo SE dan información de la superficie muy detallada

mientras que en modo EEB las imágenes muestran una alta sensibilidad a las diferencias del número atómico de modo que cuanto mayor número atómico más brillante aparecerá la zona de la imagen.

Algunas de las imágenes obtenidas en SEM modo SE están recogidas en la **figura 13**. Si comparamos la imagen (**13a**) de control de *E. coli* respecto a la imagen (**13b**) correspondiente a *E. coli* con MIC de [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) encontramos claras diferencias en la morfología de las bacterias. En la imagen (**13b**) se observa una clara afección en la membrana de las bacterias, en algunos casos la lisis completa de esta, encontrando lo que puede ser el contenido citoplasmático dispersado en el medio. En las imágenes obtenidas para *E. coli* con MIC de [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) también se observan en algunos casos pequeñas y numerosas agregaciones alrededor de la bacteria. También para el caso de *E. coli* con 1/2 MIC de [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**) se pueden ver estas afecciones en la membrana así como agregados de posiblemente bacterias, contenido de membrana y compuesto antibacteriano. Este hecho se ilustra en la imagen (**13c**). En el caso de la incubación de *E. coli* con 5-FU (**figura 13d**) también se observan daños en la pared celular aunque aparentemente diferentes a los vistos en (**13b**) y (**13c**), probablemente indicando que el 5-FU actúa, de algún modo, de forma distinta que los compuestos [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) y [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**) para el caso de *E. coli*.

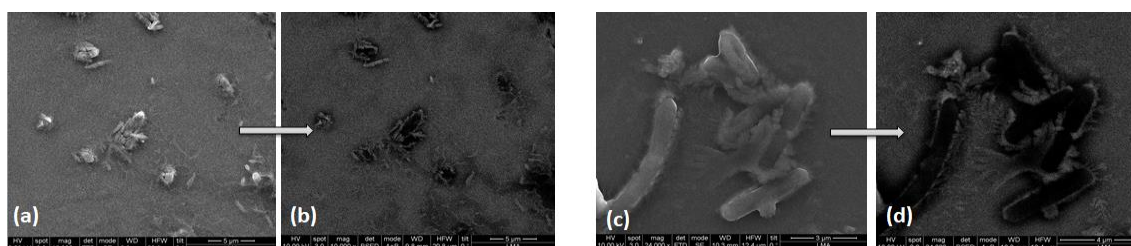


**Figura 13.** Visualización mediante SEM modo electrones secundarios (SE) **(a)** Control de *E. coli*, **(b)** *E. coli* con MIC de [Au(5-FU)(PTA)] (**1**), **(c)** *E. coli* con 1/2 MIC de [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**), **(d)** *E. coli* con 4096 µg/mL de 5-FU; **(e)** Control de *B. subtilis*, **(f)** *B. subtilis* con 1/2 MIC de [Au(5-FU)(PTA)] (**1**), **(g)** *B. subtilis* con MIC de [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**), **(h)** *B. subtilis* con MIC de 5-FU.

En el caso de *B. subtilis* se observan también cambios drásticos al comparar las imágenes del control de *B. subtilis* sin tratamiento (**figura 13e**) con las imágenes obtenidas con el tratamiento con 5-FU (**figura 13h**), [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) (**figura 13g**) y [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**) (**figura 13h**). En presencia de los compuestos antibacterianos 5-FU, **1** y **2** las bacterias forman agregados, y se observan deformaciones, daños o desprendimientos en la membrana plasmática.

Por otro lado, las imágenes obtenidas mediante modo EEB muestran halos brillantes alrededor de las bacterias. Como se ha dicho anteriormente, en modo EEB las zonas más brillantes indican la presencia de átomos más pesados. En este caso, aunque no con total certeza, este metal pesado podría tratarse del oro. Posiblemente el compuesto de oro se acumula alrededor

de las bacterias provocando su muerte. Las imágenes (b) y (d) de la **figura 14** son ejemplos de esta descripción y ocurre en ambas cepas bacterianas estudiadas.



**Figura 14.** Visualización mediante SEM modo electrones secundarios (SE) y retrodispersados (EEB) **(a)** *Bacillus subtilis* con MIC de  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2] \text{ (2)}$  modo SE, **(b)** *Bacillus subtilis* con MIC de  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2] \text{ (2)}$  modo EEB, **(c)** *Escherichia coli* con 1/2 MIC de  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2] \text{ (2)}$  modo SE, **(d)** *Escherichia coli* con 1/2 MIC de  $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2] \text{ (2)}$  modo EEB.

## 4. Sección experimental

### 4.1. Equipos y técnicas experimentales para determinación estructural

#### 4.1.1. Resonancia magnética nuclear

Para los espectros de resonancia magnética nuclear se ha empleado un espectrómetro Bruker AV-400 que operó a 400 MHz para  $^1\text{H}$ , a 162 MHz para  $^{31}\text{P}$  y a 376.52 MHz para  $^{19}\text{F}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm respecto los disolventes de referencia utilizados que fueron tetrametilsilano para  $^1\text{H}$ , 85% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  para  $^{31}\text{P}$  y  $\text{CFCl}_3$  para  $^{19}\text{F}$ . Los espectros se registraron sobre muestras en disolución en  $\text{DMSO-d}_6$  o  $\text{D}_2\text{O}$ . Las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en hercios (Hz).

#### 4.1.2. Espectroscopía infrarroja

Para los espectros de infrarrojo se ha utilizado un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 que abarca un rango de  $4000$  a  $250 \text{ cm}^{-1}$ . Los compuestos se han analizado en estado sólido mediante el dispositivo ATR. Solo se describen las bandas más características del espectro.

#### 4.1.3. Espectrometría de masas

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro Bruker Esquire 3000+ en modo MALDI+ (TOF) utilizando como matriz DCTB. Los resultados se expresan según la relación  $m/z$  e intensidad del pico (%).

### 4.2. Preparación de los productos de partida

#### 4.2.1. Síntesis de $[\text{AuCl}(\text{tht})]^{25}$

Se añade a un vaso de precipitados que contiene 2 mL de agua y 10 mL de etanol una disolución de  $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1 g, 3 mmol). Mientras la mezcla se agita con un núcleo magnético se adiciona tht poco a poco observando la aparición de un precipitado de color amarillo,  $[\text{AuCl}_3(\text{tht})]$ , que cambia a  $[\text{AuCl}(\text{tht})]$ , de color blanco, a medida que se sigue adicionando el tht. Se deja de adicionar cuando ya no se observa la aparición de ningún



precipitado. Tras 15 minutos agitando la mezcla, esta se filtra a vacío y se lava con etanol. Se obtiene un sólido blanco. Rdto. 80% (0.7715 g).

#### 4.2.2. Síntesis de DAPTA <sup>30</sup>

Se disuelve PTA (6.25 g, 39.6 mmol) en un matraz de fondo redondo de 250 mL equipado con un embudo de adición con 80 mL de agua destilada. Se mantiene esta disolución a 0 °C en un baño de hielo. Se agita la disolución con un agitador magnético y se añade gota a gota con el embudo de adición anhídrido acético (11.2 mL, 119 mmol) durante 20 minutos. La disolución resultante es incolora y transparente. La disolución se deja reposar en el baño unos 30 minutos hasta alcanzar temperatura ambiente. Se evapora el disolvente hasta sequedad en un rotavapor y posteriormente el sólido se disuelve en acetona caliente y se filtra a vacío.

**DAPTA:** Sólido blanco Rdto.: 48% (4.3647 g) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ= 5.49 (d, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub>= 16 Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>N), 4.95 (d, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub>= 16Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>N), 4.33 (d, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub>=16Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>N), 3.49 (d, <sup>1</sup>J<sub>H-H</sub>= 12Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>N), 1.95 (s, 6H, C(O)CH<sub>3</sub>) ppm <sup>31</sup>P {**1H**} (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ=-75.28 ppm

#### 4.2.3. Preparación de clorofosfinas de oro (I): [AuCl(PR<sub>3</sub>)]

##### 4.2.3.1. Síntesis de [AuCl(PR<sub>3</sub>)] (PR<sub>3</sub>= PTA, DAPTA y PPh<sub>3</sub>)

En un matraz de 100 mL de base redonda se añade [AuCl(tht)] (1 mmol, 0.32 g) en 10 mL de diclorometano. Se agita la mezcla con un núcleo magnético hasta la disolución de [AuCl(tht)] y se añade 1 mmol de la fosfina (PR<sub>3</sub>) correspondiente (0.157 g, 0.229 g, 0.262 g para PTA, DAPTA y PPh<sub>3</sub> respectivamente) y 5 mL de diclorometano. Se deja reaccionar la mezcla durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se obtiene una disolución incolora y transparente que se evapora a vacío hasta aparición de un precipitado. Se usa hexano como agente precipitante, se filtra el sólido a vacío y se lava con dietiléter.

##### 4.2.3.2. Síntesis de [AuCl(PR<sub>3</sub>)] (PR<sub>3</sub>= TPPTS)

En un matraz de 100 mL de base redonda se añade [AuCl(tht)] (1 mmol, 0.32 g) y TPPTS (1 mmol, 0.568 g) en 40 mL de metanol. Se agita la mezcla con un núcleo magnético durante 40 minutos a temperatura ambiente dejándola reaccionar. Después se filtra la disolución con tierra de diatomeas y se evapora el disolvente a vacío hasta aparición de precipitado. Se usa dietiléter como agente precipitante, se filtra el sólido a vacío y se lava con dietiléter.

**[AuCl(TPPTS)]:** Sólido blanco Rdto.: 88% (0.7027 g) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 7.85 (m, 6H), 7.60 (td, J=8 Hz, 4Hz, 3H), 7.40 (dd, J= 12Hz, 8 Hz, 3H) ppm <sup>31</sup>P {**1H**} (162 MHz, DMSO): δ= -34.01 ppm IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3700-3100 (OH).

##### 4.2.3.3. Síntesis de [AuCl(PR<sub>3</sub>)] (PR<sub>3</sub>= HMPT)

En un tubo Schlenk con 15 mL de acetona bajo atmósfera de argón se añade [AuCl(tht)] (1 mmol, 0.32 g) y HMPT (97% p/p, 0.898 g/mL, 1 mmol, 187 μL). Se agita la mezcla con un núcleo magnético durante 1 hora a temperatura ambiente. La disolución resultante se filtra con tierra de diatomeas, se evapora el disolvente a vacío hasta aparición de precipitado y se usa hexano como agente precipitante. Finalmente el sólido se filtra a vacío.

**[AuCl(HMPT)]:** Sólido gris Rdto.: 79% (0.3133 g) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ= 2.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 12Hz, 18H) ppm <sup>31</sup>P {**1H**} (162 MHz, DMSO): δ= -109.73 ppm

### 4.3. Preparación de complejos $[\text{Au}_x(5\text{-FU})(\text{PR}_3)_x]$ ( $\text{PR}_3 = \text{PTA}, \text{DAPTA}, \text{PPh}_3, \text{TPPTS}$ y $\text{HMPT}$ , $x = 1$ ó $2$ )<sup>24</sup>

#### 4.3.1. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PTA})]$ (1)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL con núcleo magnético se adiciona 5-FU (0.2 mmol, 26 mg) y KOH (90% p/p, 0.2 mmol, 12.47 mg) en 5 mL de metanol. Tras la adición del KOH se observa la aparición de turbidez blanca. Se deja la mezcla en agitación durante 10 minutos. Después se añade  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  (0.2 mmol, 78 mg), 10 mL de metanol y se deja reaccionar la mezcla durante 24 horas. Finalmente se evapora el disolvente a vacío y usando dietiléter como agente precipitante se observa la precipitación de un sólido. Este sólido se filtra a vacío, se lava con dietiléter y se seca.

#### 4.3.2. Síntesis de $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$ (2)

Se realiza el mismo procedimiento que en (1) pero usando 0.1 mmol de 5-FU (13.01 mg), 0.24 mmol de KOH (14.96 mg), 0.19 mmol de  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  (74.02 mg) y 2 horas de reacción.

#### 4.3.3. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)]$ (3)

Se realiza el mismo procedimiento que en (1) pero usando  $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$  (0.2 mmol, 98.94 mg) en lugar de  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  y 2 horas de reacción.

#### 4.3.4. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{TPPTS})]$ (4)

Se realiza el mismo procedimiento que en (1) pero usando  $[\text{AuCl}(\text{TPPTS})]$  (0.2 mmol, 160 mg) en lugar de  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  y 1 hora de reacción.

#### 4.3.5. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{DAPTA})]$ (5)

Se realiza el mismo procedimiento que en (1) pero usando  $[\text{AuCl}(\text{DAPTA})]$  (0.2 mmol, 92.33 mg) en lugar de  $[\text{AuCl}(\text{PTA})]$  y 3 horas de reacción.

#### 4.3.6. Síntesis de $[\text{Au}(5\text{-FU})(\text{HMPT})]$ (6)

Se realiza el mismo procedimiento que en (1) pero usando 0.15 mmol de 5-FU (19.51 mg), 0.3 mmol de KOH (18.70 mg), 0.3 mmol de  $[\text{AuCl}(\text{HMPT})]$  (118.69 mg). Se ha usado hexano en lugar de dietiléter como agente precipitante.

(1) Sólido blanco. *Rdto.*: 98% (0.0948 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.50$  (s, 1H), 4.52 y 4.37 (Sistema AB,  $J_{\text{AB}} = 12$  Hz, 6H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.35 (s, 6H,  $\text{NCH}_2\text{P}$ ) ppm  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz, DMSO):  $\delta = -55.61$  ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz, DMSO):  $\delta = -169.73$  ppm IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1695, 1583 (CO) MALDI MS (DCTB) m/z (%): 641.9 (39)  $[\text{Au}(\text{PTA})_2(5\text{-FU})]^+$ , 511.0 (32)  $[\text{Au}(\text{PTA})_2]^+$

(2) Sólido blanco. *Rdto.*: 82% (0.0696 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7.48$  (s, 1H), 4.55-4.26 (m, 24H) ppm  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -51.45, -51.97$  ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -169.89$  ppm IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1535, 1443 (CO) MALDI MS (DCTB) m/z (%): 641.8 (81)  $[\text{Au}(\text{PTA})_2(5\text{-FU})]^+$ , 511.0 (50)  $[\text{Au}(\text{PTA})_2]^+$

(3) Sólido blanco. *Rdto.*: 50% (0,0594 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.60$  (m, 16H) ppm  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz, DMSO):  $\delta = -32.78$  ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz, DMSO):  $\delta = -169.41$  ppm IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1621, 1588 (CO)

**(4)** Sólido blanco. *Rdto.*: 87% (0.1553 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ = 7.86 (s, 3H, Ar), 7.84 (d, J= 8Hz, 3H, Ar), 7.60 (t, J=8Hz, 3H, Ar), 7.54 (s, 1H, H-FU) 7.44 (m, 3H, Ar) ppm  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz, DMSO):  $\delta$ = -32.32 ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz, DMSO):  $\delta$ = -169.57 ppm IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437 (OH) 1651, 1599 (C=O) MALDI MS (DCTB) m/z (%): 523.1 [Au<sub>2</sub>(5-FU-H)]<sup>+</sup> (47)

**(5)** Sólido blanco. *Rdto.*: 91% (0.1028 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ = 7.50 (d,  $^3J_{\text{H-F}}=8\text{Hz}$ , 1H), 5.52 (d, J= 12 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.40 (dd, J=14, 12 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>P), 4.92 (d, J= 16Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.85 (d, J= 12Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>P), 4.66 (d, J=12 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.31 (d, J= 16Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>P), 4.13 (d, J= 16Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.04 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>P), 3.78 (d, 16Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>P), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz, DMSO):  $\delta$ =-29.76 ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz, DMSO):  $\delta$ =-169.86 ppm IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1625 (CO, DAPTA), 1619, 1588 (CO, 5-FU)

**(6)** Sólido gris. *Rdto.*: 46% (0.0335 g)  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$ = 7.39 (s, 1H), 2.64 (d,  $^3J_{\text{H-P}} = 12\text{Hz}$ , 18H)  $^{31}\text{P}$  {1H} (162 MHz DMSO):  $\delta$ = -111.56 y -114.00 ppm  $^{19}\text{F}$  {1H} (376.52 MHz, DMSO):  $\delta$ = -173.75 ppm MALDI MS (DCTB) m/z (%): 523.0 (100) [Au(HMPT)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>

## 4.4. Ensayos de estabilidad

### 4.4.1. Medida de estabilidad mediante absorción UV-vis

#### 4.4.1.1. Preparación de buffer fosfato salino (PBS)

Se disuelven 0.2 g de KCl, 0.27 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 8.04 g de NaCl en 900 mL de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.4 usando NaOH o HCl y se enrasa a 1 L en un matraz aforado.

#### 4.4.1.2. Preparación de muestras

Se preparan disoluciones de 10 mM en DMSO-d<sub>6</sub> para los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **5**. Para ello se han disuelto 2.4, 4.2, 2.9, 4.5 y 2.8 mg de los compuestos respectivamente a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ .

A partir de estas disoluciones madre se preparan disoluciones de  $5 \cdot 10^{-5}$  M en PBS. Para esto se han disuelto 50  $\mu\text{L}$  de la disolución madre a un volumen final de 10 mL. Para **2** en lugar de 50  $\mu\text{L}$  se disolvieron 20  $\mu\text{L}$  a 10 mL por aparición de turbidez en su disolución madre.

#### 4.4.1.3. Procedimiento y equipo

Se realiza una primera medición a temperatura ambiente de cada una de las disoluciones  $5 \cdot 10^{-5}$  M en PBS. Después estas se incuban a 37 °C y se miden a las 1, 2, 4 y 24 horas.

Las mediciones se han realizado en un espectrofotómetro de rutina convencional (Thermo Scientific Evolution 600 UV-Vis Spectrophotometer) equipado con lámparas de deuterio y de wolframio y usando cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Se midió en un rango de 200 a 700 nm. Se usó PBS como disolución de referencia.

### 4.4.2. Medida de estabilidad en presencia de NAC-ME con RMN

Para los compuestos **1**, **3**, **4** y **5** se preparan disoluciones que contengan 0.03 mmol del compuesto correspondiente y 0.03 mmol de NAC en DMSO-d<sub>6</sub>:D<sub>2</sub>O (80:20 v/v) e inmediatamente se miden sus espectros  $^1\text{H RMN}$ . Se ha preparado y medido también una disolución que solo contiene 0.03 mmol de NAC. Estas disoluciones se guardan a temperatura

ambiente y tras 24 horas se vuelven a medir sus espectros  $^1\text{H}$  RMN. Se ha usado un BRUKER-AV 300 para estas medidas.

## 4.5. Ensayos de actividad antimicrobiana

### 4.5.1. Bacterias y disolución de medio de cultivo

Se ha ensayado con las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Se ha usado medio Luria-Bertani (LB) para *Escherichia coli* y medio Nutrient broth (NB) para *Bacillus subtilis*.

### 4.5.2. Disoluciones madre de los compuestos

Se han preparado disoluciones de los compuestos **5-FU**, **1**, **2**, **3**, **4** y **5** en concentraciones escalonadas de 409.6 mg/mL, 204.8 mg/mL, 102.4 mg/mL, 51.2 mg/mL, 25.6 mg/mL, 12.8 mg/mL, 6.4 mg/mL y así sucesivamente según los requerimientos de los experimentos. Estas disoluciones se prepararon en microtubos usando DMSO como disolvente. Las disoluciones se mantienen estables a 4 °C entre experimentos.

### 4.5.3. Preparación de la disolución de bacteria

Una disolución saturada de bacteria se diluye a 1:20 (v/v) con la disolución del medio de cultivo adecuada para la bacteria a tratar.

### 4.5.4. Determinación de MIC

Se realizan los ensayos en placas de cultivos de 96 pocillos. En cada pocillo se adicionan 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo adecuado a la bacteria a estudiar, 2  $\mu\text{L}$  de la disolución madre del compuesto correspondiente y 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de la bacteria. Para cada concentración de un compuesto dado se preparan dos pocillos. También se preparan al menos seis pocillos de control positivo que contienen 100  $\mu\text{L}$  de medio y 100  $\mu\text{L}$  de disolución de bacteria y seis pocillos de control negativo que contienen 200  $\mu\text{L}$  de medio. Para la primera placa de cada bacteria se prepararon además al menos seis pocillos con 100  $\mu\text{L}$  de medio, 2  $\mu\text{L}$  de DMSO y 100  $\mu\text{L}$  de bacteria.

Se mide en un fotómetro para microplacas la absorbancia de los pocillos a 600 nm y después la placa se incuba durante unas 24 horas a 37 °C.

Al día siguiente se observan en las placas la concentración mínima para un compuesto determinado donde no hay turbidez. Se anotan los resultados. A continuación, se mide en el fotómetro para microplacas la absorbancia de los pocillos a 600 nm y se comparan con los resultados anteriores. Para ello se comparan los datos de absorción del control negativo y positivo con los demás pocillos.

### 4.5.5. Determinación de MBC

Se prepara a partir de una disolución *stock* de resazurina de 1 mg/mL en ddH<sub>2</sub>O estéril una disolución de 0.1 mg/mL de resazurina en disolución de medio de cultivo de la bacteria correspondiente a medir. La resazurina es una molécula de color azul en disolución. Una vez entra en el interior de bacterias vivas, sufre una reducción a resorufina, de color rosa. Este cambio de color, de azul a rosa, es indicativo de la presencia de bacterias viables.

Una vez realizados los ensayos oportunos para determinar la MIC, se añade a cada pocillo de la placa 25  $\mu$ L de la disolución de 0.1 mg/mL de resazurina. A continuación, se deja la placa multipocillo durante una hora en una incubadora a 37 °C protegida de la luz.

Pasada la hora, se visualizan los resultados a ojo. Para un compuesto determinado se toma como MBC la del pocillo azul de menor concentración. En caso de duda, se siembran 10  $\mu$ L de la disolución del pocillo en una placa de agar, se incuba 24 horas y se observa si hay crecimiento de colonias. En caso de que hayan crecido, significa que la concentración correspondiente no es la MBC.

## 4.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

### 4.6.1. Preparación de bacterias

Para cada bacteria se preparó una placa de cultivo de 24 pocillos donde se prepararon disoluciones con concentraciones correspondientes a 1/4xMIC, 1/2xMIC, MIC, 2xMIC y 4xMIC para los compuestos **5-FU**, **1** y **2** además del control positivo. Para ello se adicionó en el pocillo correspondiente 500  $\mu$ L de la disolución del medio de cultivo adecuada, 10  $\mu$ L de disolución madre del compuesto (para el control positivo no) y 500  $\mu$ L de la disolución de bacteria. Se dejan las placas en incubación a 37 °C durante unas 24 horas.

Se observaron los pocillos de las placas y en base a la turbidez de estos se escogieron las disoluciones de los más pertinentes para visualizar los efectos de los compuestos en SEM; aquellas donde no haya turbidez pero sin excederse.

Con los pocillos elegidos se procede a la fijación de las bacterias. Para ello se recogen las disoluciones de los pocillos en microtubos y se centrifugan a 3000 rpm durante 15 minutos. Se elimina el sobrenadante de los microtubos, se resuspende el *pellet* en 1.5 mL de PBS estéril y se centrifugan a 3000 rpm durante 15 minutos. Se vuelve a eliminar el sobrenadante, resuspende en 1.5 mL de tampón fosfato 10 mM (pH = 7.2) con 2.5% (v/v) de glutaraldehído y se deja agitando en noria rotatoria durante dos horas. A continuación, se lavan las bacterias con PBS (x1) y agua milliQ (x3) en cuatro ciclos de centrifugado y resuspensión. Por último, se elimina sobrenadante y resuspende por una última vez usando 1.5 mL de agua milli-Q. Esta disolución es la que se usa para SEM.

## 5. Conclusiones

1. Se ha conseguido sintetizar y caracterizar satisfactoriamente los complejos [Au(5-FU)(PTA)] (**1**), [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**), [Au(5-FU)(PPh<sub>3</sub>)] (**3**), [Au(5-FU)(TPPTS)] (**4**) y [Au(5-FU)(DAPTA)] (**5**) mediante la reacción de [AuCl(PR<sub>3</sub>)] (PR<sub>3</sub>= PTA, PPh<sub>3</sub>, TPPTS, DAPTA) con 5-FU y KOH con estequiometría 1:1:1 para **1,3,4** y **5** y estequiometría 2:1:2 para **2** en MeOH como disolvente obteniendo rendimientos entre 50 a 98%.
2. Únicamente se ha obtenido el complejo dinuclear para el caso de la fosfina PTA, debido probablemente a un mayor requerimiento espacial de las demás fosfinas.
3. Los complejos [Au(5-FU)(PTA)] (**1**), [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**), [Au(5-FU)(PPh<sub>3</sub>)] (**3**), [Au(5-FU)(TPPTS)] (**4**) y [Au(5-FU)(DAPTA)] (**5**) se pueden considerar estables, al menos durante 24 horas, tras su incubación 37°C en PBS como disolvente, así como frente a nucleófilos tales como NAC-ME.
4. En general, los compuestos sintetizados resultaron tener propiedades antibacterianas notables. Destaca el compuesto [Au(5-FU)(PTA)] (**1**) por ser bastante activo tanto frente a *Escherichia coli* (Gram-) (MIC= 32 µg/mL) como a *Bacillus subtilis* (Gram+) (MIC= 8 µg/mL) pudiendo ser un potencial antibacteriano de amplio espectro. También destaca el complejo [Au(5-FU)(PPh<sub>3</sub>)] (**3**) al presentar un MIC de 1 µg/mL frente a *Bacillus subtilis*. En general los complejos resultaron tener mayores valores de MIC y MBC frente a *B. subtilis* que *E. coli*.
5. Se han relacionado los diferentes valores de MIC encontrados con el tipo de bacteria, la lipofilidad o hidrofiliidad y el tamaño de los complejos obteniendo argumentos coherentes con la teoría.
6. Se han podido visualizar, mediante microscopía electrónica de barrido, los daños que los compuestos [Au(5-FU)(PTA)] (**1**), [Au<sub>2</sub>(5-FU)(PTA)<sub>2</sub>] (**2**) y 5-FU ejercen a las bacterias a concentraciones próximas o iguales al MIC. Asimismo, se ha observado que es posible que el oro se esté acumulando en la pared celular de las bacterias.

## 6. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (accessed June 5 2021)
2. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed June 5 2021)
3. Frei, A. A.; Zuegg, J.; Elliott, A. G.; Baker, M.; Braese, S.; Brown, C.; Chen, F.; G. Dowson, C.; Dujardin, G.; Jung, N.; King, A. P.; Mansour, A. M.; Massi, M.; Moat, J.; Mohamed, H. A.; Renfrew, A. K.; Rutledge, P. J.; Sadler, P. J.; Todd, M. H.; Willans, C. E.; Wilson, J. J.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2627
4. B. Rosenberg, L.; Vancamp, T.; Krigas. *Nature*. **1965**, *205*, 698-699
5. B. Rosenberg, L.; VanCamp, J.E.; Trosko.; V.H. Mansour. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. **1969**, *222*, 385-386
6. Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; I.Lachowicz, J.; Crisponi G.; Zoroddu M.A. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *284*, 329-350.
7. Evans, A.; Kavanagh, Kevin A. Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. *J. Med. Microbiol.* **2021**, *70*, 001363.
8. Biegański, P.; Szczupak, Ł; Arruebo, M.; Kowalski, K. Brief survey on organometalated antibacterial drugs and metal-based materials with antibacterial activity. *RSC chem. biol.* **2021**, *2*, 368-386.
9. Glišić, B. Đ; Djuran, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: An overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 5950-5969.
10. Eisler, R. Chrysotherapy: A Synoptic Review. *Inflamm. Res.* **2003**, *52* (12), 487–501.
11. Fricker, S.P. Medical uses of gold compounds: Past, present and future. *Gold Bull.* **1996**, *29*, 53–60.
12. Onodera, T.; Momose, I.; Kawada, M. Potential Anticancer Activity of Auranofin. *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 186-191.
13. Roder, C.; Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R&D.* **2015**, *15*, 13-20.
14. Yeo, C. I.; Ooi, K. K.; Tiekink, E. R. T. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules.* **2018**, *23*.
15. Zou, T.; Lum, C. T.; Lok, C.; Zhang, J.; Che, C. Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8786-8801
16. Dennis, E. K.; Kim, J. H.; Parkin, S.; Awuah, S. G.; Garneau-Tsodikova, S. Distorted Gold(I)–Phosphine Complexes as Antifungal Agents. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2455-2469.
17. Stenger-Smith, J. R.; Mascharak, P. K. Gold Drugs with {Au(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>}<sup>+</sup> Moiety: Advantages and Medicinal Applications. *ChemMedChem.* **2020**, *15*, 2136-2145.
18. A Rangel-Vega, A.; Bernstein, L. R.; Mandujano-Tinoco, E. A.; García-Contreras, S. J.; García-Contreras, R. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 282.
19. Thomson, J. M.; Lamont, I. L. Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 952.
20. Heidelberg, C.; Chaudhuri, N.K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* **1957**, *179*, 663-666.
21. Fischer, J.; Ganellin, C. Robin. Analogue-based Drug Discovery. *JWS.* **2006**, 511.
22. Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, *3* (5), 330-8.

23. Amagai, T.; K. Miyamoto, T.; Ichida, H.; Sasaki, Y. Preparation and Crystal Structure of New Gold(I) Complexes Linked to Pyrimidines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 1078-1080.
24. Atrián, E. Síntesis dirigida de compuestos metálicos solubles en agua en función de sus aplicaciones biomédicas. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, diciembre **2015**, 70-77, 256-257
25. Usón R.; Laguna, A.; Laguna M. *Inorg. Synth.* **1989**, *26*, 85-91.
26. Abdrakhimova, G. S.; Ovchinnikov. M. Y.; Lobov, A. N.; Spirikhin, L. V.; Ivanov, S. P.; Khursan, S. L. 5-fluorouracil solutions: NMR study of acid-base equilibrium in water and DMSO. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27*, 876-883.
27. Markova, N.; Enchev, V.; Ivanova, G. Tautomeric equilibria of 5-fluorouracil anionic species in water. *J. Phys. Chem. A.* **2010**, *114*, 13154-13162.
28. Kouroulis, K. N.; Hadjidakou, S. K.; Kourkoumelis, N.; Kubicki, M.; Male, L.; Hursthouse, M.; Skoulika, S.; Metsios, A. K.; Tyurin, V. Y.; Dolganov, A. V.; Milaeva, E. R.; Hadjiliadis, N. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of new Au(III) and Au(I) complexes with thioamides. *Dalton Trans.* **2009**, 10446-10456
29. Isab, A.; Ahmad, S.; Arnold, A. Gold(I) complexes with selenones and triphenylphosphine as ligands. *Transition. Met. Chem.* **2004**, *29*, 870-873.
30. Darensbourg, D. J.; Ortiz, C. G.; Kamplain, J. W. A New Water-Soluble Phosphine Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane (PTA), 3,7-Diacetyl-1,3,7-triaza-5-phospha-bicyclo[3.3.1]nonane. Structural, Bonding, and Solubility Properties. *Organometallics.* **2004**, *23*, 1747-1754.
31. Fernández, G. A.; Vela Gurovic, M. S.; Olivera, N. L.; Chopa, A. B.; Silbestri, G. F. Antibacterial properties of water-soluble gold(I) N-heterocyclic carbene complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *135*, 54-57.
32. Mokhtari, V.; Afsharian, P.; Shahhoseini, M.; Kalantar, S. M.; Moini, A. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J.* **2017**, *19*, 11-17.
33. Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil> (accessed June 15 2021)
34. Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triphenylphosphine> (accessed June 15 2021)