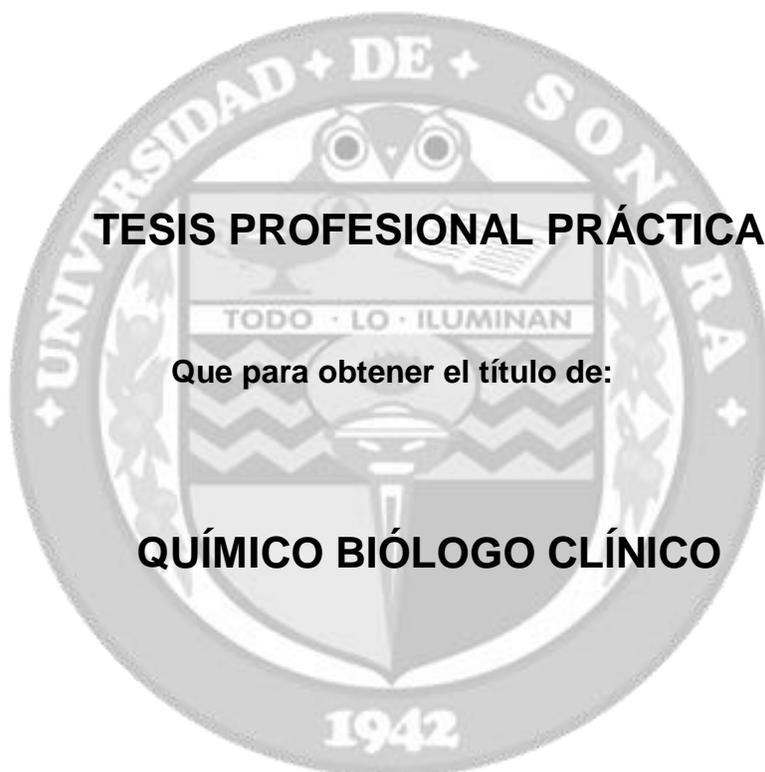


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Evaluación de Biguanidas como Catalizadores en la Ruptura de un Sustrato Modelo de ARN (2-hidroxipropil *p*-nitrofenil fostato) en Mezclas de DMSO–Agua.



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Josue Fernando Grajeda Alvarez

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros designados para revisar la Tesis Profesional de Josue Fernando Grajeda Alvarez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. David Octavio Corona Martínez

Presidente

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz

Secretario

Dra. María Rosario Martínez Macías

Vocal

Dra. Idania Emedith Quintero Reyes

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. David Octavio Corona Martínez, por su esfuerzo, dedicación y paciencia para la realización de este proyecto. De igual forma gracias por la confianza y amistad que se ha desarrollado a través de los años, misma que me ha ayudado a crecer como profesionista y sobre todo como persona.

A mis sinodales, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz, Dra. Idania Emedith Quintero Reyes, Dra. María del Rosario Martínez Macías, por la revisión y contribución a esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Mariana, Alan, Rafael y Enrique por su apoyo dentro del laboratorio para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas, para quienes mi gratitud no tiene límites, a quienes no podré parar nunca los principios sobre todo con el ejemplo que influyeron en mi vida desde la niñez, hasta llegar a ser lo que soy. Hoy es un día feliz, porque he logrado una de las más importantes metas de mi vida, que sin ustedes nunca hubiera alcanzado.

Gracias por ser mi esperanza, por enseñarme la responsabilidad y la justicia que debo emplear en mi futuro. Lo valioso no se encuentra en un papel, si no en la defensa que hare por él. Por todo ello a Dios y a ustedes gracias.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
INDICE DE SIGLAS	7
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
OBJETIVOS	14
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	16
ANTECEDENTES	17
Catálisis Ácido-Base	17
Guanidinos	19
Biguanidas	20
Metformina	21
Metabolismo de la Metformina	22
Metformina y el Cáncer	24
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Reactivos	28
Sustrato	28
Disolventes	29
Equipo	29
Programas	29
Metodología: Estudios Cinéticos	29
Perfil de Concentración	32
Perfil de Neutralización	33
Cálculo de la Constante de Catálisis Básica Específica	34
Estudios Potenciométricos	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37

Determinación de los valores de pK_w del agua y de pK_a de Metformina, Moroxidina y TBGu	38
Efecto de la Hidrólisis Básica Específica	43
Efecto de la Concentración Total del Amortiguador	47
Efecto del Grado de Neutralización del Amortiguador	53
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

INDICE DE SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Akt	Proteína cinasa serina/treonina
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosín trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
CBP	Proteína de unión Src
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	Elemento de unión de respuesta a AMP _c
DM ₂	Diabetes mellitus tipo dos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidemiológico
ECV	Enfermedad cardiovascular
HpNPP	2-hidroxipropil <i>p</i> -nitrofenilfosfato
IGF	Factor de crecimiento insulínico
LKB ₁	Cinasa de hígado B ₁
mTor	Diana de rampimicina en células de mamífero
NAFLD	Enfermedad del hígado no alcohólica
OCT1/3	Transportador de cationes orgánicos 1/3
OCT1	Transportador de cationes orgánicos 1

OCT3	Transportador de cationes orgánicos 3
PCOS	Síndrome poliquístico de ovario
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PMAT	Proteína transportadora plasmática de monoamina
pKa	Medida de la acidez de una sustancia obtenida a partir del cologaritmo de su constante de disociación ácida K_a
pKw	Constante de disociación del agua
Ser436	Serina 436
Src	Citosina cinasa citoplasmática
STK11	Serina treonina cinasa 11
Thr172	Treonina 172
VHB	Virus de hepatitis B
VHC	Virus de hepatitis C

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores de pK _w a 37 °C en las diferentes mezclas de DMSO-agua, I = 100 mM.	38
2	Valores de pK _a de Metformina a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua.	40
3	Valores de pK _a de TBGu a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua.	42
4	Relación de los valores obtenidos para las constantes de rapidez de la reacción entre HpNPP con iones de hidróxido a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua con una fuerza iónica controlada de 0.1 M.	44
5	Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas DMSO-agua.	45
6	Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (Metformina) de acuerdo al porcentaje de DMSO.	48
7	Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (Moroxidina) en 80% DMSO.	50
8	Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (TBGu) en 80% DMSO.	52
9	Dependencias de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la Metformina en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de DMSO.	54
10	Dependencia de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de la Moroxidina en la transesterificación del HpNPP a 37°C en 80% DMSO.	55
11	Dependencia de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de la TBGu en la transesterificación del HpNPP a 37°C en 80% DMSO.	55

12 Constantes de la catálisis básica general de cada catalizador en las mezclas utilizadas.

60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Perfil de energía de Gibbs para una reacción sin catalizar (a) y una reacción catalizada por ácido (b).	17
2	Ejemplo de calixarenos con moléculas de guanidinio en su estructura.	19
3	Ejemplos de guanidinas como fragmentos dentro de las moléculas de fármacos.	20
4	Estructura básica de la biguanida.	21
5	Farmacocinética de la metformina.	23
6	Metabolismo celular.	24
7	El control de la proliferación celular y el crecimiento del tumor por la metformina.	26
8	Metformina y cáncer.	27
9	Reacción de transesterificación del HpNPP.	28
10	Reacción general observada de la hidrólisis de HpNPP.	30
11	Ajuste de la ecuación para formación del 4-nitrofenolato.	31
12	Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador: (a) perfil orden cero, (b) perfil de primer orden y (c) perfil de segundo orden.	32
13	Perfil de concentración de iones OH al 60% DMSO-agua, en la reacción de transesterificación del HpNPP a 37°C	34
14	Grafica de volumen de base añadida contra el pH.	36
15	Relación de los valores de pKw determinados en las mezclas DMSO-agua.	38

16	Relación de los valores de pK_w determinados en las mezclas de DMSO-agua en función de su fracción molar.	39
17	Curva de valoración del cloruro de metforminio a 37°C en la mezcla de 80% DMSO.	40
18	Valores de pK_a de la metformina en función de la fracción molar de DMSO.	41
19	Valores de pK_a de la TBGu en función de la fracción molar de DMSO.	42
20	Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio 10-60% en las mezclas DMSO-agua.	43
21	Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio 70 y 80% en las mezclas DMSO-agua.	46
22	Variación de las constantes de rapidez básica específica contra el porcentaje de DMSO.	46
23	Variación de los valores del log de KOH contra el valor de autoionización del agua (pK_w).	47
24	Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con metformina a 37°C en las mezclas DMSO-agua, 50 a un 60%.	49
25	Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con metformina a 37°C en las mezclas DMSO del 70 al 80%.	50
26	Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con moroxidina a 37°C en las mezclas DMSO al 80%.	51
27	Perfil de concentración en la catálisis del HpNPP con TBGu a 37°C en la mezcla DMSO al 80%.	52
28	Perfil de variación de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de metformina en: (a) 50 y 60% y (b) 70 y 80%.	54
29	Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la moroxidina en 80% DMSO.	56

30	Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la TBGu en 80% DMSO.	56
31	Perfiles de neutralización (k_{obs}) de metformina comparado con el perfil corregido (k_{corr}) (a) en 50% de DMSO y (b) en 80% de DMSO.	58
32	Perfil de neutralización en 80% de DMSO para la ruptura del HpNPP con metformina.	59
33	Relación entre las constantes cinéticas y los valores de pKa de los catalizadores utilizados.	60

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad catalítica de amortiguadores de pH elaborados con metformina, moroxidina y 1-(o-tolil) biguanida en diferentes mezclas de DMSO-agua para la reacción de transesterificación del 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenilfosfato (HpNPP).

Particulares

Obtener los valores de pK_w de las mezclas acuosas de DMSO utilizadas a 37°C.

Encontrar la mezcla de DMSO–agua de mayor actividad catalítica del tipo ácido–base en la transesterificación del HpNPP mediante el uso de amortiguadores hechos con metformina.

Determinar los valores de pK_a para la metformina, moroxidina y la 1-(o-tolil) biguanida en la mezcla de DMSO – agua de mayor actividad catalítica.

Determinar los valores de la constante de rapidez para la catálisis por iones hidróxido en la ruptura del HpNPP.

Determinar la ley de la rapidez del HpNPP en la mezcla DMSO–agua de mayor actividad catalítica, para metformina, moroxidina y 1-(o-tolil) biguanida.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio cinético de la reacción de transesterificación de un sustrato modelo de ARN, 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenilfosfato (HpNPP). Los experimentos realizados se llevaron a cabo en mezclas de dimetilsulfóxido (DMSO) con agua en diferentes proporciones volumen/volumen (desde un 50% hasta un 80% de DMSO) a una temperatura de 37°C en presencia de los amortiguadores de biguanidas [Metformina, Moroxidina, 1-(*o*-tolil) biguanida (TBGu)]. En cada una de las mezclas analizadas se pudo observar que el valor de pKw crece conforme aumenta el porcentaje de DMSO. El efecto del disolvente tuvo una correlación con su fracción molar, con la ecuación: $pKw = 11.42 (0.17) X_{DMSO} + 13.05 (0.06)$. En el caso de los valores de pKa de las biguanidas estudiadas no muestran mucha variación en los porcentajes estudiados, los valores encontrados fueron: 13.8, 13.2 y 10.4 para metformina, moroxidina y TBGu, respectivamente. En los estudios se encontró que la catálisis básica específica (por iones hidróxido) varió desde 0.09 a 0.6 M⁻¹ s⁻¹ de 10 a 80% de DMSO. Además, se encontró correlación con el valor de pKw con la siguiente ecuación: $\log k_{OH} = 0.18(0.01) pKw - 3.54(0.10)$. Para conocer la actividad catalítica se hicieron perfiles de concentración, en donde se encontró que todas las bases usadas catalizan la reacción. Sin embargo, el resultado encontrado en los perfiles de neutralización fue que en todos los casos se tiene una contribución de más de una ruta: la catálisis básica general (por las biguanidas) y la catálisis básica específica (por iones hidróxido). La ley de rapidez obtenida fue: $k_{obs} = k_B[B] + k_{OH}[OH^-] + k_0$; en 80% de DMSO los valores de k_B fueron 4.75×10⁻⁴, 4.02×10⁻⁴ y 3.70×10⁻³ M⁻¹s⁻¹. La ley de rapidez, indica un mecanismo con la participación de la forma básica en la ruptura. Además, se encontró una correlación con fuerza de los catalizadores con la siguiente ecuación: $\log k_B = 0.41(0.04) pKa - 8.82(0.43)$. Del presente trabajo se resalta que por primera vez se informa la catálisis con este tipo de sistemas en ésteres de fosfato. Esto puede tener múltiples aplicaciones en el entendimiento de mecanismos de acción de los fármacos derivados de biguanidas con lo que podría ampliarse su aplicación.

INTRODUCCIÓN

Los ésteres de fosfato son moléculas ubicuas en la naturaleza. Participan en la respiración celular, glucólisis, glucogenólisis, la transmisión de impulsos nerviosos entre otros procesos metabólicos. Los fosfodiésteres forman parte de la estructura de las moléculas del ADN y ARN. Desde el punto de vista de la ingeniería genética, un paso muy importante para manipular el material genético es la hidrólisis eficiente y selectiva de estas moléculas, que son las encargadas de almacenar la información genética de los seres vivos. Los fosfodiésteres son poco reactivos debido a que presentan una carga negativa (la cual se comparte entre dos oxígenos) y esto los hace menos electrofílicos en comparación con los triésteres. La reactividad de los diésteres dependerá significativamente del nucleófilo y del grupo saliente (Kirby AJ y Hollfelder F. 2009).

Por otro lado, los triésteres de fosfato son tóxicos en su mayoría y se han utilizado como pesticidas y armas químicas, por lo que existe interés ambiental en el tratamiento y desactivación de estos compuestos mediante su hidrólisis para evitar que se formen subproductos tóxicos por medio de pirolisis y se pueden producir sustancias de toxicidad semejante o mayor (Sánchez I. 2010, Shneider HJ y Yatsimirsky AK. 2003).

La transferencia del ion fosfato es una de las reacciones biológicas más comunes e importantes, pero también es una de las más demandantes en cuanto a la energía de activación requerida. La naturaleza ha encontrado dos caminos principales para la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Uno es el uso de iones metálicos como cofactores en el interior de las enzimas y el otro es sólo mediante una catálisis general ácido-base (Shneider HJ y Yatsimirsky AK. 2003). La importancia de la comprensión del mecanismo de la hidrólisis de los ésteres de fosfato, radica en que proveerá una base sólida para el diseño racional de fosfodiesterasas artificiales más eficientes que puedan funcionar como agentes terapéuticos y tener otros usos potenciales (Nome F y col. 2008).

En este proyecto se evaluó la transesterificación de un sustrato modelo del ARN, 2-hidroxiopropil *p*-nitrofenilfosfato (HpNPP), con sistemas amortiguadores de pH elaborados con biguanidas en mezclas acuosas de dimetilsulfóxido con agua. Lo anterior se hará mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible. Las biguanidas a evaluar son de interés y uso farmacéutico y resulta importante conocer si uno de sus mecanismos de acción es mediante la ruptura de ésteres de fosfato.

ANTECEDENTES

Catálisis Ácido–Base

La catálisis es un término utilizado para designar una reacción en la cual interviene un catalizador. Un catalizador es aquella sustancia que acelera una reacción química (catalizador positivo), sin modificarse químicamente (Carey FA y Sunberg RJ. 2007). Desde el punto de vista práctico un catalizador es aquella sustancia que acelera una reacción sin considerar el destino de la reacción, es importante mencionar que llamar catalizador a una sustancia que retarda una reacción es incorrecto, a este tipo de sustancia se le llama inhibidor.

Un catalizador baja la energía de activación sin modificar la energía de Gibbs, debido a que la reacción catalizada ocurre mediante un mecanismo diferente. Lo anterior, genera que la reacción ocurra más rápido incluso en ambas direcciones de la reacción. Un catalizador no afecta la entalpía o energía de Gibbs de los productos ni de los reactivos. Es así como un catalizador incrementa la rapidez de la reacción para alcanzar un equilibrio sin alterar la constante termodinámica de equilibrio (Moore JK. 1961, Isaacs N. 1987). ΔG .

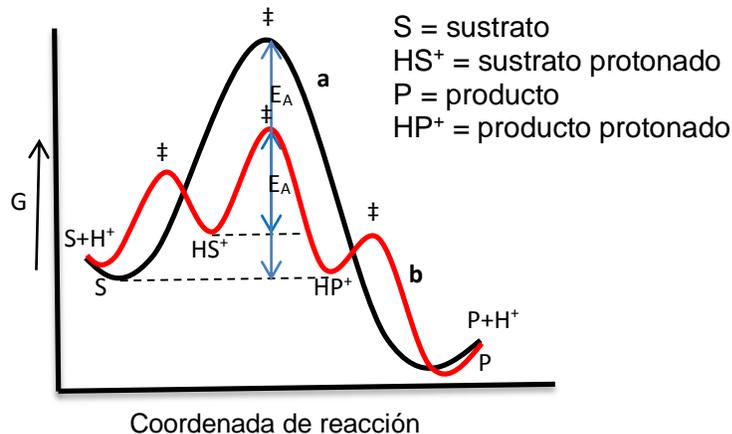


Figura 1. Perfil de energía de Gibbs para una reacción sin catalizar (a) y una reacción catalizada por ácido (b). (Corona DO. 2010)

La catálisis ácido-base ocurre cuando el sustrato es más reactivo después de una protonación o desprotonación respectivamente. Desde hace tiempo se sabe que durante una catálisis ácido-base no sólo intervienen el ion hidronio y el ion hidróxido, sino también intervienen en ella algunos ácidos y bases débiles que pueden encontrarse en los productos (Moore JK. 1961 y Isaacs N. 1987).

Para este tipo de catálisis tenemos la siguiente ecuación empírica de rapidez:

$$V = [S](k_0 + k_{H^+}[H^+] + k_{OH^-}[OH^-] + k_{HA}[HA] + k_B[B]) \quad \text{Ec. 1}$$

En la ecuación anterior, HA representa un ácido débil y B representa una base débil y k_{HA} , k_B son sus respectivas constantes catalíticas. Cuando la catálisis se lleva a cabo por iones hidronio e hidróxido, se le conoce como catálisis ácido-base específica, mientras que donde no participan los iones hidronio e hidróxido (H^+ y OH^-) recibe el nombre de catálisis ácido-base general. Se puede identificar los distintos tipos de catálisis experimentalmente mediante la observación de la dependencia de la constante de rapidez con la concentración del amortiguador.

Una de las formas más efectivas para discriminar experimentalmente entre ambas rutas es realizar experimentos con una serie de disoluciones amortiguadoras de pH haciendo variar la concentración y manteniendo constante la proporción de neutralización. Otro experimento podría hacerse manteniendo la concentración del amortiguador constante y variando la fracción de neutralización del amortiguador. Si en el primer experimento obtenemos una gráfica de la dependencia de la constante de rapidez con la concentración del amortiguador y observamos una dependencia lineal (o no lineal en algunos casos) con una pendiente mayor que cero, estaremos hablando de una catálisis ácido-base general. En este caso el segundo experimento ayudaría a discriminar si la dependencia es con la base, con la forma ácida o con ambas formas del amortiguador (Jencks WP. 1969).

Sin embargo, si en el primer experimento obtenemos una gráfica con pendiente de cero y en el segundo una gráfica en donde exista una dependencia de la constante de rapidez con la fracción de neutralización (que está directamente relacionada con la concentración de los iones hidronio e hidróxido) con pendiente mayor a cero, estaremos en el caso de una reacción catalizada por la ruta ácido-base específica (Corona DO. 2011).

La relevancia de los grupos fosfato en biología y química y su resistencia a la hidrólisis han animado muchos científicos a diseñar y sintetizar catalizadores artificiales capaces de escindir ADN, ARN y sus compuestos modelo con la idea de utilizar estos sistemas en los objetivos relacionados con la salud. En fosfodiesterasas artificiales, como en todos los catalizadores supramoleculares, un papel principal lo desempeña el andamiaje molecular que

debe ser un compromiso entre pre organización y flexibilidad, manteniendo las funciones activas a la distancia apropiada y en una orientación favorable (Salvio R y col. 2015).

En los últimos años, distintos grupos de investigadores se han dado a la tarea de llevar a cabo ensayos en los cuales reproducen este tipo de mecanismos (ácido-base) utilizando amortiguadores de pH, ya que con ellos se pueden tener dos especies que pueden catalizar las reacciones. Cada grupo utiliza distintos tipos de moléculas, pero todos ellos han partido de moléculas sencillas como guanidinas y derivados de imidazol. A partir de estas moléculas se han elaborado moléculas más complejas, las cuales contienen estos grupos catalíticos. En la Figura 2 podemos observar, por mencionar un ejemplo, el uso de calixarenos derivatizados (Salvio R y col. 2015).

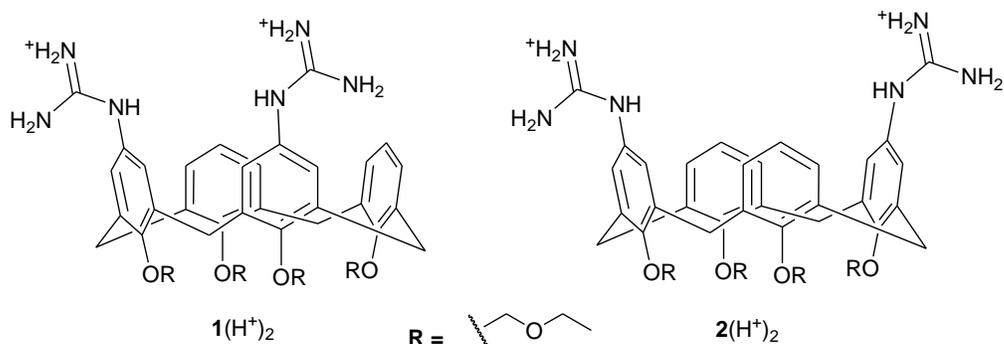


Figura 2. Ejemplo de calixarenos con moléculas de guanidinio en su estructura.
(Salvio R y col. 2015)

Guanidínios

Con los años, hemos sido testigos de nuevos logros en la síntesis de moléculas que contienen guanidina, dichos avances son de gran importancia en las ciencias químicas, bioquímicas, y áreas farmacológicas (Moreno CA y col. 2014; Ekelund S y col. 2001). Las reacciones catalíticas están emergiendo como una potencial y eficiente alternativa para la síntesis. La búsqueda de catalizadores que sean aplicables a una amplia gama de sustratos con el objetivo final de obtener moléculas específicas con aplicaciones o propiedades complementarias es una continua tendencia en el área química (Moreno CA y col. 2014)

Algunos ejemplos de guanidinas como parte de la estructura de moléculas en fármacos son la famotidina (Figura 3a), un antagonista de los receptores H₂ de la histamina que inhibe la producción de ácido en el estómago, la rosuvastatina (Figura 3b), recetado para bajar los niveles

de colesterol y triglicéridos y la prevención de ataques al corazón, la metformina (Figura 3c), un medicamento antidiabético, el MGBG (Figura 3d), un agente antitumoral en ensayos clínicos con una actividad significativa en los pacientes con quimioterapia de refractario de linfoma no Hodgkin y linfoma, y el imatinib (Figura 3e), un fármaco inhibidor de cinasas usado para tratar ciertos tipos de leucemia y tumores del estroma gastrointestinal (Bravo I y col. 2016).

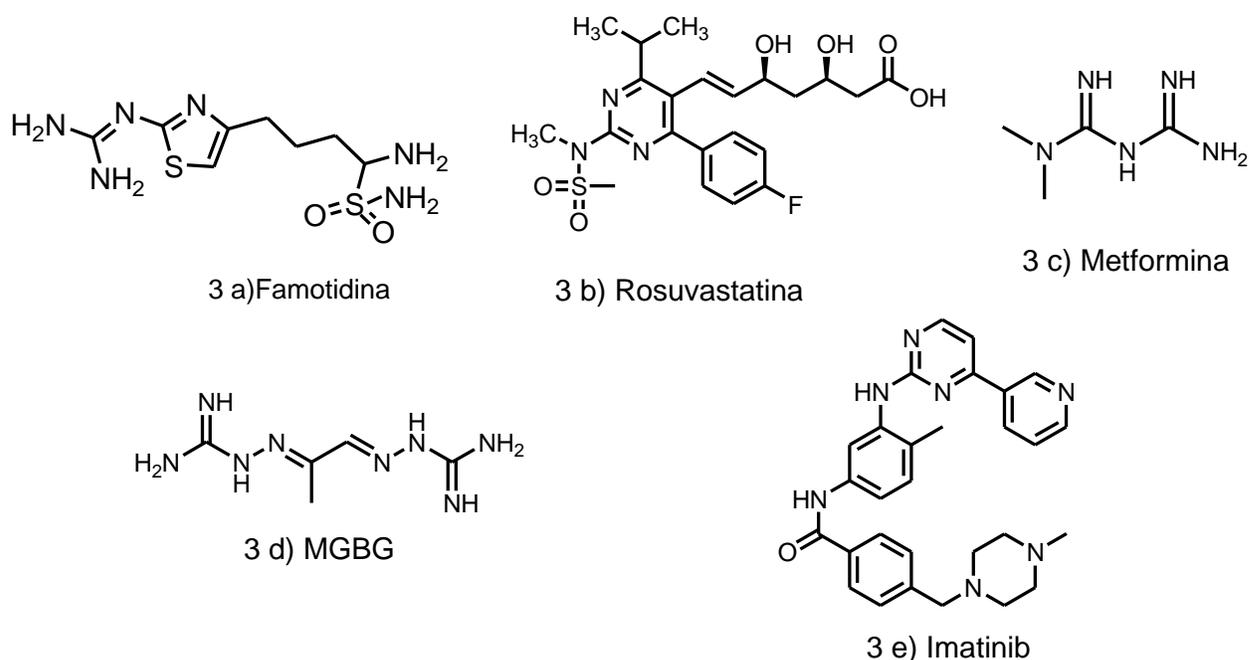


Figura 3. Ejemplos de guanidinas como fragmentos dentro de las moléculas de fármacos.

Biguanidas

Las biguanidas son moléculas que, a diferencia de las moléculas de guanidina, poseen una parte ácida y una parte básica en la misma molécula (Figura 4). Clínicamente, las biguanidas se usan como un grupo de medicamentos contra la diabetes mellitus o como antivirales, algunos de uso comercial (amgrip®, Virobis®) y otros en procesos de experimentación. A diferencia de otros antidiabéticos orales como las sulfonilurea y las meglitinidas, las biguanidas no afectan la liberación de insulina. Por lo tanto, no sólo son efectivas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 sino que pueden también ser efectivas en la diabetes mellitus tipo 1 en conjunto con la terapia insulínica.

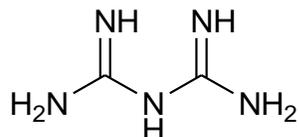


Figura 4. Estructura básica de la biguanida.

El mecanismo exacto de la acción de las biguanidas como la metformina no se entiende por completo desde el punto de vista molecular, pero sí se conocen las vías de señalización involucradas. Se sabe que en las hiperinsulinemias, las biguanidas mejoran los niveles de insulina en plasma sanguíneo en pacientes en ayunas. Las biguanidas tienden a hacer que las células del cuerpo absorban la glucosa circulante, reduciendo la glucemia. Sus usos terapéuticos derivan de su capacidad de reducir la gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado y, como resultado, reducen los niveles de glucosa sanguíneos. En los eritrocitos, la metformina incrementa la captación de glucosa independientemente de la insulina (Madiraju AK y col. 2014). La acción reductora sobre la glucemia no depende de la presencia de células beta pancreáticas funcionales sino que aumenta la unión de la insulina en el músculo y el tejido adiposo de modo que la glucosa pueda absorberse y reduce la absorción de glucosa desde el intestino; además, también es capaz de reducir las concentraciones plasmáticas del glucagón (Madiraju AK y col. 2014).

Metformina

La metformina, una biguanida derivada de la lila francesa (planta: *lila syringa*), se ha convertido en la terapia preferida de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Este fármaco es barato, tiene una excelente seguridad para el consumidor y se puede combinar de forma segura con otros agentes antidiabéticos sin producir efectos dañinos en la salud. Como resultado, se ha convertido en el medicamento más ampliamente prescrito contra la diabetes en todo el mundo (Suissa S y Azoulay L. 2014). Los principales mecanismos propuestos para la supresión de la producción hepática de glucosa por acción de la metformina siguen siendo objeto de estudio. Hace más de una década fue descubierto que posee la capacidad para activar AMPK (proteína cinasa activada por AMP) aumentando su fosforilación neta de la subunidad catalítica en la Thr172 (Treonina 172) en hepatocitos primarios (Zhou G y col. 2001; Viollet B y col. 2009).

Las investigaciones iniciales sobre la acción de metformina encontraron que este compuesto es un inhibidor del complejo I mitocondrial en concentraciones milimolares (El-Mir MY y col. 2000; Owen MR, Doran E y Halestrap AP. 2000). Por otra parte, AMPK es una proteína filogenéticamente conservada de serina/treonina, visto como un indicador del balance energético de la célula, desempeña un papel crucial en la protección celular, ya que funciona bajo condiciones de bajo valor energético. AMPK es una proteína que consiste de una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras no catalíticas, β y γ . Cada subunidad tiene al menos dos isoformas, que se activan por un aumento en la relación de AMP/ATP intracelular que resulta de un desequilibrio entre la producción de ATP y el consumo. La activación de AMPK resulta en la fosforilación de CBP [proteína de unión src (citosina cinasa citoplasmática) en la Ser436 (serina 436)], que a su vez conduce al desensamble del complejo activador de CREB (elemento de unión de respuesta a AMPc, CREB por sus siglas en inglés) y la posterior inhibición de la expresión. En contraste con estos resultados, se ha sugerido que la metformina suprime la gluconeogénesis independientemente de AMPK, estos datos indican que la inhibición del complejo de la cadena respiratoria mitocondrial I puede ser uno, pero no el único efecto de la metformina (Madiraju AK y col. 2014).

Al ser activada la AMPK, las células cambian de un estado anabólico a un estado catabólico, disminuyendo el ATP que consumen vías de síntesis, hasta la restauración en el balance de energía. Esta regulación implica la fosforilación por la AMPK de enzimas metabólicas clave y factores de transcripción, como resultado, la glucosa, lípidos y proteínas, así como de células de crecimiento, son inhibidas, mientras que la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa se estimulan (Viollet B y col. 2009).

Metabolismo de la Metformina

Después de la administración oral, la metformina se absorbe en el enterocito a través de la proteína transportadora plasmática de monoamina (PMAT) y el transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3) en la membrana plasmática y sale de los enterocitos a través del transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1) en la membrana basolateral (Figura 5). Después de la captación hepática a través OCT1, la mitocondria es el objetivo principal de la metformina, con el objetivo de inhibir la función de AMPK en la cadena respiratoria I. La metformina es administrada directamente al hígado a través de la vena porta. Las concentraciones plasmáticas en la vena porta son entre 40 y 70 mM en animales después de una dosis terapéutica. La

absorción de la metformina en el hígado es a través del transportador de cationes orgánicos (OCT1/3) en la membrana de los hepatocitos, mientras que la metformina se excreta del hepatocito por el transportador 1 (Mate1) (He L y col. 2009).

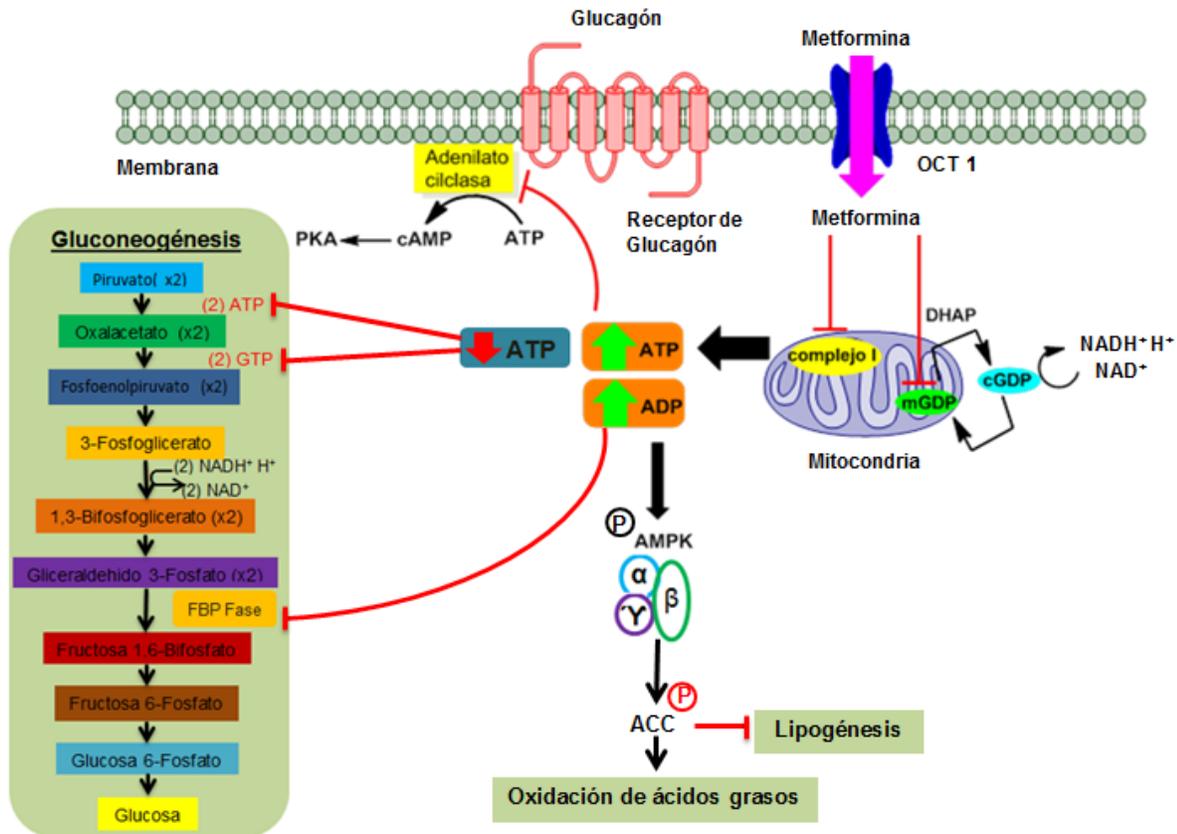


Figura 5. Farmacocinética de la metformina.

Fuente: Adaptado de He L y col. 2009.

El efecto principal de este fármaco de la familia de biguanida es disminuir de forma aguda la producción de glucosa hepática, principalmente a través una inhibición leve y transitoria de la cadena respiratoria mitocondrial (complejo I) Figura 6. Más allá de su efecto sobre el mecanismo de la glucosa, se ha informado que la metformina es capaz de restaurar la función ovárica en PCOS (el síndrome poliquístico de ovario), reducir el hígado graso y disminuir complicaciones microvasculares y macrovasculares asociadas con la DM2 (Diabetes Mellitus tipo dos) (Viollet B y col. 2012).

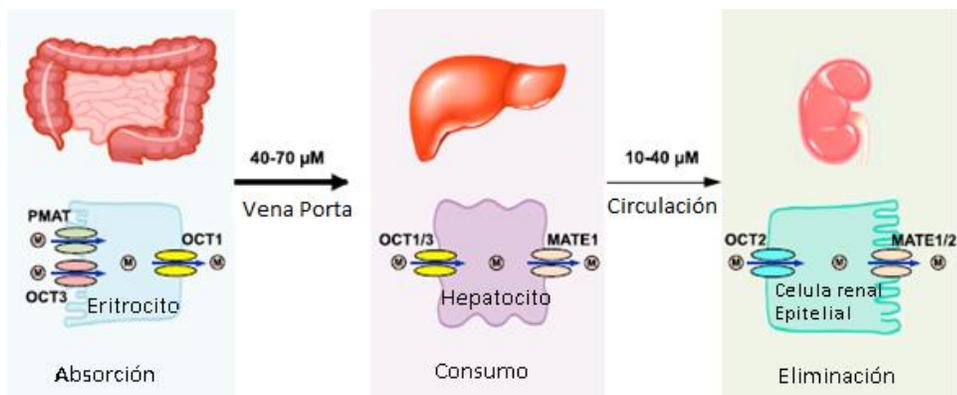


Figura 6. Metabolismo celular.

Fuente: Adaptado de Foretz M y col. 2014

Metformina y el Cáncer

Por más de un siglo la metformina ha sido utilizada como un fármaco para el tratamiento de la DM2. En la actualidad hay estudios que lo consideran como un agente potencial contra el cáncer. Los estudios epidemiológicos han asociado sistemáticamente el uso de metformina con una disminución de la incidencia de cáncer y la mortalidad relacionada con el cáncer. Estudios recientes prospectivos de casos y controles realizados en grandes poblaciones han confirmado que la DM2 se asocia con un aumento significativo del riesgo de cáncer, principalmente afectan a la mama, colón, próstata, riñón y páncreas. Numerosos estudios clínicos han demostrado los efectos anticancerígenos de la metformina, dando lugar a una explosión de interés en la evaluación de este agente en el cáncer humano. Los efectos de la metformina sobre los niveles circulantes de insulina indican una eficacia potencial hacia cánceres asociada con hiperinsulinemia (Dowling RJO y col. 2012).

La metformina es un fármaco relativamente seguro, con conocida farmacocinética y la toxicidad manejable. Su mayor toxicidad es de leve a moderado malestar gastrointestinal, generalmente auto limitado y mejorado por un gradual descenso de la dosis. Su toxicidad más grave es la acidosis láctica, la que se presenta en casos muy aislados (Bodmer M y col. 2008). La NAFLD (enfermedad del hígado graso no alcohólica) primaria se relaciona con resistencia a la insulina y por lo tanto con frecuencia se produce como parte de los cambios metabólicos que acompañan a la obesidad, la diabetes y la hiperlipidemia. Sin embargo, es importante excluir causas secundarias de la esteatosis hepática (Adams LA y col. 2005; Adams LA, Angulo P 2006;

Angulo P 2002; Ekstedt M y col. 2006; Marchesini G y col. 2005; McCullough AJ 2006; Day CP, James OF. 1998).

La acumulación de grasa hepática está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina, lo cual aumenta la lipólisis del tejido adiposo periférico con el consiguiente aumento del flujo de la grasa en el hígado en forma de ácidos grasos libres. Además, la resistencia a la insulina promueve de nuevo la síntesis de triglicéridos en el hígado e inhibe la oxidación del ácido graso promoviendo así la acumulación de triglicéridos (Browning JD, Horton JD 2004; Farrell y Larter 2006; Adams LA, Angulo P 2006; Angulo P 2002; Marchesini G y col. 2005; McCullough AJ. 2006). Los datos recientes sugieren que la presencia de hígado graso no alcohólico en la diabetes tipo 2 también pueden estar relacionado con el aumento de enfermedad cardiovascular (ECV), la identificación de las personas con hígado graso no alcohólico que también ponen de relieve un subgrupo de los pacientes diabéticos que debe ser dirigida con una terapia más intensiva para disminuir el riesgo de futuros eventos cardiovasculares (Targher G y col. 2005; Targher G y col. 2006).

Estudios realizados recientemente en países industrializados como Italia han demostrado una creciente incidencia entre la obesidad y el aumento de la prevalencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólica, además se puede observar un descenso de la tasa de enfermedades hepáticas como el virus de hepatitis C (VHC) y el virus de hepatitis B (VHB) mientras la tasa de enfermedad del hígado graso no alcohólica va en aumento (Portincasa P y col. 2005; Sagnelli E y col. 2005; Stroffolini T y col. 2004).

No hay evidencia de interacciones importantes del uso de metformina con las terapias estándar contra el cáncer. Debido a esto, las evaluaciones clínicas de la metformina como un agente anticancerígeno paso directamente a la Fase II y las pruebas de la Fase III. Lo que refleja la rápida acumulación de evidencia preclínica, clínica y epidemiológica que puede tener efectos benéficos contra el cáncer, a pesar del hecho de que los mecanismos precisos de la acción potencial anticancerígena siguen sin resolverse Figura 7 (Goodwin y col. 2011).

La acción antineoplásica de la metformina parece ser ejercida por varias vías. La metformina inhibe el crecimiento de células cancerosas mediante la inversión de la hiperglucemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Lo que resulta en niveles reducidos de glucosa, insulina e **IGF** (Factor de crecimiento insulínico) y la activación de vías de señalización de crecimiento a través de sus receptores respectivos. Los efectos antitumorales de la metformina parecen estar reguladas por ambos mecanismos dependientes o independientes de la AMPK. Lo que lleva a la inhibición de **mTOR** (diana de rapamicina en células de mamífero) de señalización, el ciclo celular por una disminución en el nivel de la ciclina D1, síntesis de ácidos grasos, la

angiogénesis y la inflamación, **EGF** (factor de crecimiento epidérmico); **PI3K** (fosfatidilinositol-3-cinasa) (Viollet B y Foretz M. 2012).

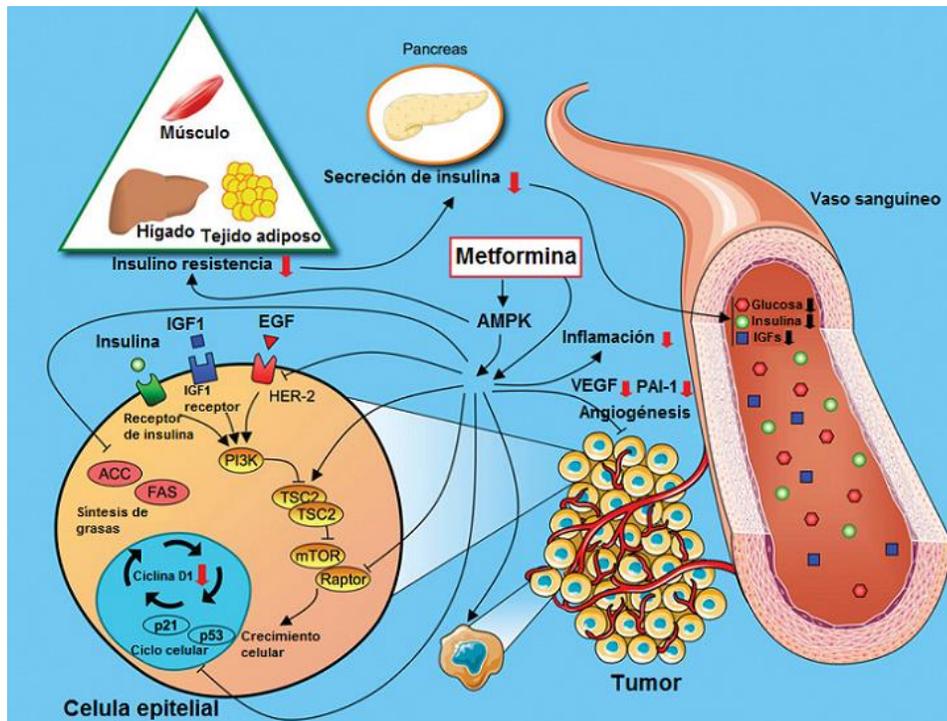


Figura 7. El control de la proliferación celular y el crecimiento del tumor por la metformina.

Fuente: Adaptado de Viollet B y Foretz M 2012.

Estudios previos han demostrado que la metformina es capaz de reducir la tasa de incidencia de una variedad de tumores en pacientes con diabetes. En estudios in vitro, se ha encontrado una capacidad para reducir el volumen de los tumores de próstata en ratones e inhibir el crecimiento y la proliferación de cáncer de mama, próstata, cervical y de ovario. Sin embargo, el mecanismo antitumoral de la metformina sigue siendo poco claro. AKT es una proteína cinasa de serina/treonina, tiene una función vital en múltiples procesos celulares, incluyendo la regulación del crecimiento celular, la proliferación y la apoptosis. PI3K es la molécula de secuencia la más importante para activar AKT. Estudios anteriores han demostrado que el aumento de las actividades de PI3K y AKT juega un papel importante en el desarrollo de numerosos tipos de tumores.

Recientemente se ha descubierto su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales. La vía de señalización de PI3K/AKT se ha encontrado que desempeña un papel

importante en la supervivencia, la proliferación y la apoptosis de las células tumorales Figura 8 (Giovannucci E y col. 2010).

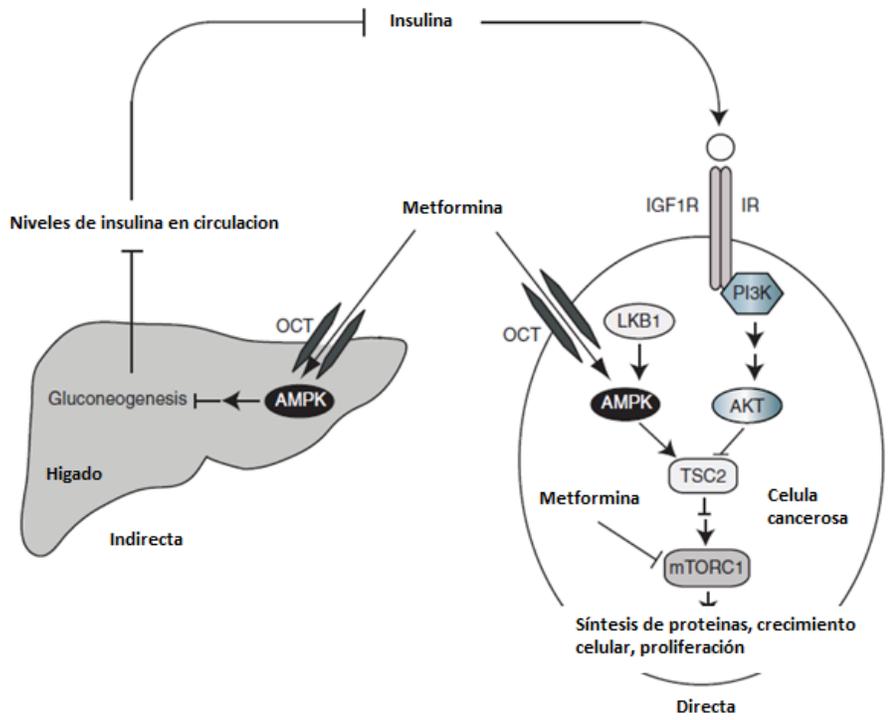


Figura 8. Metformina y el cáncer.

Fuente: Adaptado de Dowling RJO y col. 2012

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes compuestos: hidróxido de tetrametilamonio ($M = 181.23 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 97%), cloruro de tetrametilamonio ($M = 109.60 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 99%), cloruro de metforminio ($M = 165.62 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 97%), cloruro de moroxidinio ($M = 207.66 \text{ g mol}^{-1}$, pureza 99%), 1-(*o*-tolil) biguanida ($M = 191.23 \text{ g mol}^{-1}$, pureza 98%), ácido clorhídrico ($M = 36.46 \text{ g mol}^{-1}$, densidad = 1.2 g/mL, pureza del 37%) e hidrógeno ftalato de potasio [biftalato de potasio] ($M = 204.22 \text{ g mol}^{-1}$, pureza del 99.95 %). Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich y fueron usados sin tratamiento previo. El amortiguador usado como catalizador se generaba *in situ* con el cloruro de metforminio, cloruro de moroxidinio y 1-(*o*-tolil) biguanida con hidróxido de tetrametilamonio en las proporciones estequiométricas adecuadas.

Sustrato

Para la realización de los estudios cinéticos se empleó como sustrato el diéster de fosfato, 2-hidroxipropil *p*-nitrofenilfosfato (HpNPP) con masa molar de 276.16 g/mol. El sustrato fue sintetizado de acuerdo con lo informado por Brown y Usher (Brown DM y Usher DA. 1965) con la reacción del 4-nitrofenilfosfato y el óxido de propileno y fue proporcionado por el director del proyecto. Este compuesto es un modelo del ARN ampliamente utilizado. Su reacción de ruptura es irreversible y da como producto el 4-nitrofenolato en valores de pH alcalinos (Figura 9). Este último es fácilmente detectable por espectrofotometría del ultravioleta visible, debido a que tiene una banda característica en la región del visible a 400 nm en agua.

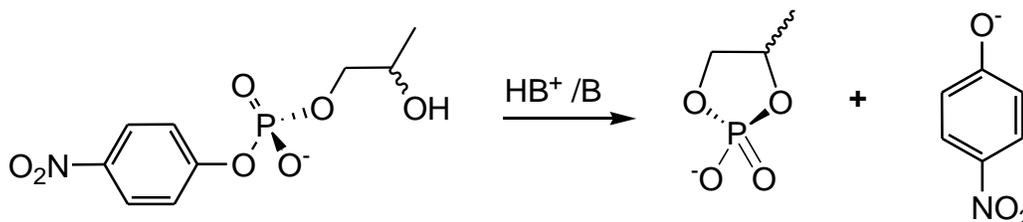


Figura 9. Reacción de transesterificación del HpNPP.

Disolventes

Para la realización de todos los experimentos se utilizó agua desionizada obtenida del equipo Barnstead Nanopure, donde el agua obtenida tenía una resistencia de 18.2 M Ω que equivale a 0.055 microsiemens. El Dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó fue adquirido de Aldrich con una pureza del 99.5% y fue utilizado sin ningún tratamiento previo. En todos los ensayos se utilizaron mezclas DMSO–agua, las mezclas evaluadas se hicieron desde 50% hasta el 80% de DMSO y el resto de agua, con incrementos de 10% de DMSO en cada mezcla estudiada hasta llegar a 80% de DMSO.

Equipo

Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro modelo Cary 60 de doble haz de luz (con lámpara de Xenón), equipado con multicelda y un recirculador de agua PCB1500, ambos equipos de marca Agilent Technologies. Las titulaciones se hicieron con un potenciómetro digital marca Metrohm modelo 780, con el uso de un electrodo de vidrio marca Metrohm (aquatrodo). Durante los experimentos se mantuvo constante la temperatura a 37 °C utilizando un baño de recirculación de agua marca Julabo modelo FP45-HL.

Programas

El análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos y de las titulaciones potenciométricas, se hizo con el programa OriginPro™ versión 9.0 de 64 bits. Los valores de pK_a fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2008 versión 2.1 NT.

Metodología: Estudios Cinéticos

Las reacciones con el HpNPP (Figura 10) se siguieron espectrofotométricamente con la medición de la aparición del anión 4-nitrofenolato. Durante la síntesis del sustrato se forma un isómero de la molécula del HpNPP, el cual también es considerado en la reacción. La hidrólisis del isómero es mucho más rápida debido a que el grupo hidroxilo presenta menor impedimento estérico, lo cual permite que la desprotonación ocurra de más rápido y con esto comienza la reacción de transesterificación. El isómero del sustrato es considerado también en los ajustes de las curvas de todas las cinéticas que se llevaron a cabo.

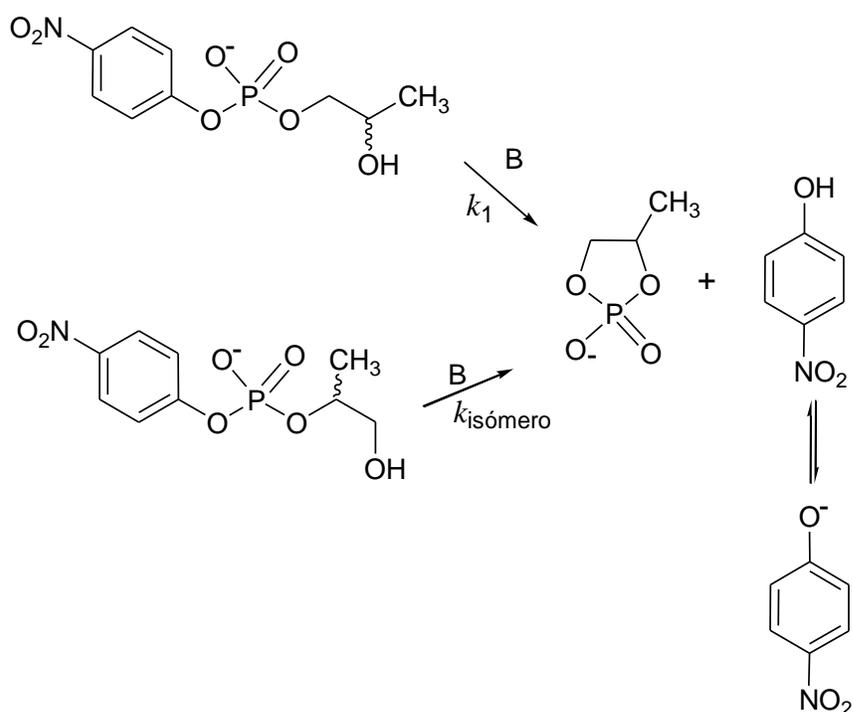


Figura 10. Reacción general observada de hidrólisis de HpNPP.

La solución del sustrato se preparó en agua, haciéndola pasar por una columna con resina Amberlite IR-120H de intercambio iónico para eliminar el catión Ba^{2+} (para purificar el sustrato, el mismo es transformado en la sal de bario, de ahí la necesidad de removerlo), que puede ocasionar interferencia con los estudios cinéticos.

Para los estudios cinéticos se utilizaron mezclas de DMSO con agua en una proporción variable volumen/volumen desde 50 hasta 80% de DMSO para cada perfil. Las mezclas se elaboraron incrementando 10 por ciento de DMSO en cada mezcla hasta llegar a 80 por ciento. La disolución madre del sustrato HpNPP se hizo sólo en agua y fue de una concentración 10 mM. Todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. El volumen dentro de las celdas fue de 2.5 mL y la temperatura de todos los experimentos fue de 37°C . Las reacciones se iniciaron mediante la adición de una alícuota de la disolución del HpNPP.

En estos experimentos se monitoreo la formación del producto de la transesterificación intramolecular del HpNPP, el 4-nitrofenolato. Para ello se obtuvo el valor de absortividad molar en las condiciones del experimento ($\epsilon = 23,700 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la mezcla con 50% de DMSO hasta $\epsilon = 29,000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en la mezcla de 80% de DMSO) en la longitud de máxima absorción (en la mezcla al 80% de DMSO agua fue de 420 nm). En los experimentos cinéticos se tuvieron

condiciones de pseudoprimer orden, es decir, el sustrato se mantuvo a una concentración mucho menor que la de las bases usadas (20 μM), para realizar el análisis como cinéticas de primer orden.

En todas las cinéticas con metformina, moroxidina y 1-(*o*-tolil) biguanida, la transesterificación fue completa, por ello las constantes de rapidez observadas se obtuvieron mediante el ajuste no lineal de la siguiente ecuación.

$$A = \Delta A_{\infty,1}(1 - e^{-k_1 t}) + \Delta A_{\infty,iso}(1 - e^{-k_{iso} t}) + A_0 \quad \text{Ec. 2}$$

La ecuación corresponde a la formación de dos productos de forma paralela mediante una cinética de primer orden. A es la absorbancia en cualquier momento, ΔA_{∞} es la diferencia entre la absorbancia inicial y la infinita, A_0 es la absorbancia al inicio, k_{obs} es la constante de rapidez observada y t es el tiempo. En la Figura 11 se muestra un ejemplo de un ajuste con la ecuación mencionada anteriormente.

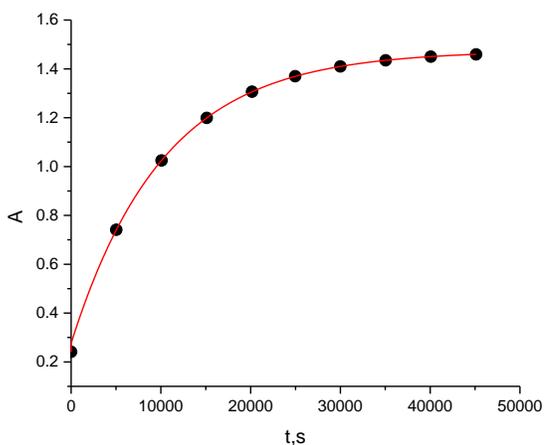


Figura 11. Ajuste de la ecuación para formación del 4-nitrofenolato.

Perfil de Concentración

Para conocer el efecto que tiene la concentración del amortiguador (catalizador) sobre la reacción de ruptura del sustrato, se elaboraron perfiles donde se hizo variar la concentración del amortiguador desde 0.02 a 0.1 M, a una fracción de neutralización del amortiguador constante del 50% en todas las mezclas realizadas de DMSO-agua. Con este perfil se buscó conocer si existe la catálisis o no. En caso de existir, con este perfil se puede conocer el orden respecto al catalizador.

Las opciones posibles más comunes se ilustran en la Figura 12. En la curva **a** se observa un comportamiento de orden cero respecto al catalizador lo cual indica que no existe la catálisis. Esto se presenta porque no hay dependencia con la concentración del mismo y se ve reflejado en la pendiente de valor cero ($y = k_0$). En la curva **b** se observa un comportamiento lineal, es decir, una dependencia de orden uno con relación al catalizador ($y = k_{cat}[\text{Cat}]_T + k_0$). Esto podría deberse a la participación de alguna de las especies del amortiguador (catalizador). Finalmente, en la curva **c** vemos un comportamiento cuadrático, característico de una reacción de segundo orden ($y = k_{cat}[\text{Cat}]_T^2 + k_{cat}[\text{Cat}]_T + k_0$). Este tipo de perfiles puede deberse a una contribución de segundo orden de la base, del ácido o bien de ambos al mismo tiempo.

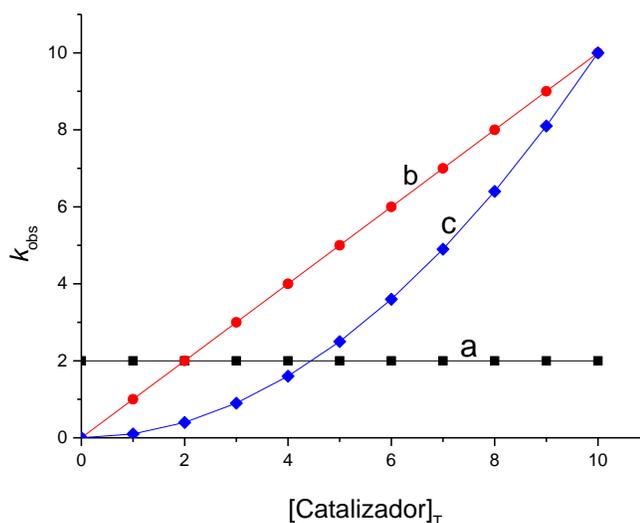


Figura 12. Perfiles posibles de la variación de las constantes de rapidez en función de la concentración del catalizador: (a) perfil de orden cero, (b) perfil de primer orden y (c) perfil de segundo orden.

Para generar estos perfiles, se varía la concentración del catalizador en cada una de las celdas, manteniendo constante el perfil de neutralización, la proporción del disolvente y la concentración del sustrato (en condiciones de pseudoprimer orden).

Perfil de Neutralización

Para conocer las especies del amortiguador que participan en el mecanismo de la reacción de transesterificación del HpNPP, se elaboraron perfiles de neutralización en cada mezcla de DMSO–agua a estudiar. En este tipo de perfiles se mantuvo la concentración total del amortiguador constante en un valor de 0.1 M y se hizo variar la fracción del amortiguador desde 0.1 a 0.9 (es decir, del 10 al 90% de neutralización).

Con la elaboración de estos tipos de perfiles se buscó conocer que fracción del amortiguador era la que beneficiaba a la catálisis. En el caso en el que ambas fracciones del amortiguador sean las que llevan a cabo la catálisis, se obtiene un perfil característico de una curva en forma de campana.

Cálculo de la Constante de Catálisis Básica Específica

Para confirmar o descartar la contribución de la catálisis básica en la transesterificación del HpNPP, se elaboraron perfiles de dependencia de la constante catalítica respecto a la concentración de hidróxido. Para este perfil, se utilizó hidróxido de tetrametilamonio como base y la concentración se hizo variar desde 0.005 a 0.02 M y de 0.01 a 0.1 M, dependiendo del porcentaje de DMSO en la mezcla. Los experimentos se realizaron en todas las mezclas de DMSO-agua estudiadas. Para conocer esta contribución se debe obtener la constante de la catálisis básica en cada mezcla de DMSO-agua. Para la obtención de este valor, se determina la pendiente de las curvas obtenidas en cada mezcla desde un 10 hasta un 80% de DMSO, ($k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}}[\text{OH}]$).

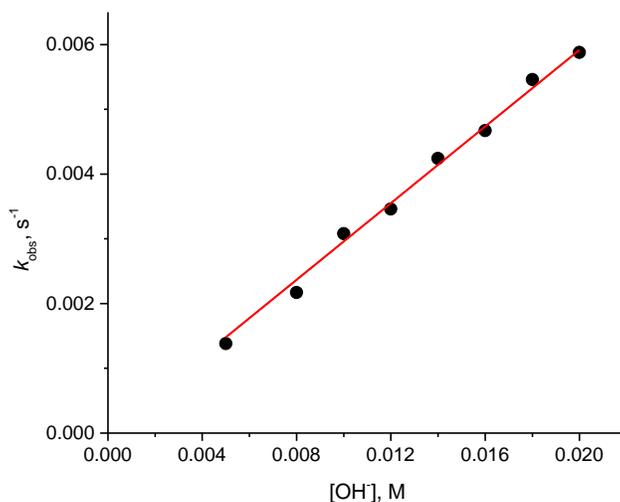


Figura 13. Perfil de concentración de iones OH^- al 60% DMSO-agua, en la reacción de transesterificación del HpNPP a $37^\circ C$.

Metodología: Estudios Potenciométricos

Las titulaciones se realizaron en mezclas de DMSO-agua a $37^\circ C$ en una celda de vidrio, cerrada y de 30.0 mL; el volumen inicial de las disoluciones a titular fue de 25.0 mL. Las disoluciones a titular se burbujearon con N_2 y se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno durante todo el experimento para evitar la presencia de CO_2 en disolución ya que la presencia de carbonatos dificulta el alcance del equilibrio en el electrodo después de cada adición de titulante. El potenciómetro se calibró usando amortiguadores de referencia a $25^\circ C$, pH 4.00, 7.00, 9.00.

Para conocer el pK_a se utilizó como soporte cloruro de tetrametilamonio para ajustar la fuerza iónica a una concentración 0.1 M. Se utilizó cloruro de metforminio, cloruro de moroxidinio y 1-(*o*-tolil) biguanida con concentración de 0.01 M para ser valorado. Como titulante se usó hidróxido de tetrametilamonio cuya concentración fue de 0.1 M en cada mezcla de DMSO-agua. El titulante también estaba en disoluciones que contenían el mismo porcentaje de DMSO y agua de la mezcla a titular. Después de las titulaciones potenciométricas, los valores de pK_a fueron calculados utilizando el programa Hyperquad 2008.

Previo a estas titulaciones, se determinó el pK_w de cada mezcla de DMSO-agua realizada a $37^\circ C$ con la valoración de 25 mL de una solución con una fuerza iónica de 0.1 M de cloruro de tetrametilamonio y ácido clorhídrico como valorante con concentración de 0.01 M (previamente

valorado) y con hidróxido de tetrametilamonio para ser valorado. Se tomaron al menos 15 puntos antes y después del punto de equivalencia para poder realizar los ajustes.

La obtención de la constante de disociación del agua K_w en la mezcla DMSO-agua, usada para calibrar el electrodo, se determinó con un ajuste no lineal mediante la ecuación de la gráfica de volumen de base añadido contra el pH (Johansson A y Johansson S. 1978); para la obtención de la constante K_w se utilizó la ecuación que se muestra a continuación:

$$V = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_w)} - f10^{-pH})}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_w)}} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde V es el volumen añadido, C_B es la concentración de la base añadida, V_0 es el volumen inicial del ácido, C_A es la concentración del ácido, pH es el valor de pH medido, pK_w es el menos logaritmo del producto iónico del agua en este medio (K_w) y f es un factor de corrección que es una función de los coeficientes de actividad y la diferencia en el potencial de la interface del electrodo (potencial de unión). De la ecuación anterior al despejar el volumen añadido (V) y al agrupar términos se obtiene la siguiente ecuación que es la que se utiliza para la titulación de un ácido fuerte con base fuerte:

$$V + \frac{V_0 + V}{C_B} f [H^+] - \frac{(V_0 + V)K'_w}{[H^+]C_B} - V_e = 0 \quad \text{Ec. 4}$$

Además de despejar el volumen añadido y reacomodar los términos, se hizo la sustitución de $[H^+]$ (que es la concentración de H^+ aparente, es decir, la calculada empleando el valor de pH medido directamente y no corregido) por 10^{-pH} , K'_w (que es el producto iónico del agua aparente sin considerar los coeficientes de actividad) por 10^{-pK_w} y finalmente V_e , el volumen de equivalencia, que al ser multiplicado por C_B es equivalente al producto de V_0 y C_A ($V_e C_B = V_0 C_A$).

En las titulaciones hechas, la concentración de la base añadida, el volumen inicial, los volúmenes adicionados, la concentración exacta del ácido fuerte a titular y los valores de pH para cada adición eran conocidos, por lo que fue posible calcular el valor de pK_w y de f . Una vez obtenidos los valores de f , se corrigieron los valores de pH observados restándoles el logaritmo de f .

$$(pH_{corr} = pH_{obs} - \log f) \quad \text{Ec. 5}$$

Los valores obtenidos de pK_w de las mezclas DMSO-agua a 37.0°C se mostrarán en el próximo capítulo (Resultados y discusión, en la sección del pK_w). En la Figura 14 se muestra un ejemplo de las gráficas obtenidas y del ajuste por la ecuación despejada.

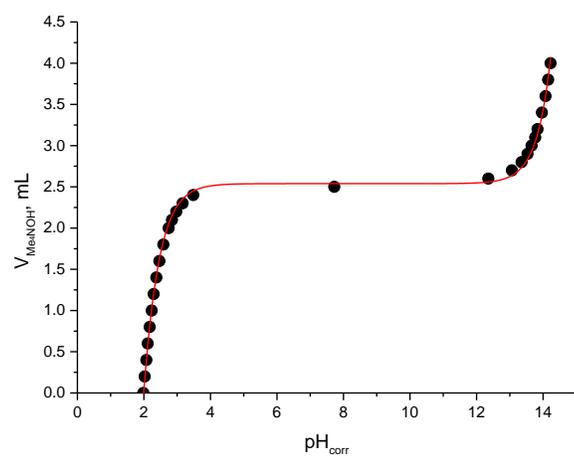


Figura 14. Gráfica de volumen de base añadida contra el pH.

RESULTADOS Y DISCUSION

Un resumen de las etapas en las que se dividió el trabajo presentado en esta tesis es el siguiente. Primero se hizo un estudio del efecto de la concentración total de metformina en las mezclas DMSO-agua (desde 50% hasta 80% de DMSO). Una vez localizada la zona en donde hubo mejor catálisis (80% de DMSO), se hicieron los estudios con las otras dos biguanidas para completar la serie, moroxidina y TBGu [1-(*o*-tolil) biguanida]. Dichos experimentos permitieron confirmar la existencia de catálisis por metformina, moroxidina y TBGu; además, brindaron información para conocer el orden de la reacción respecto al amortiguador. El intervalo de las concentraciones del catalizador que fueron usadas en este trabajo fue de 0.02 a 0.1 mol/L. Estas concentraciones se eligieron en función de la actividad catalítica y para evitar posibles efectos de codisolvente (Corona DO. 2010; Kirby AJ y col. 1998; Kirby AJ y col. 2012). Es importante señalar que este tipo de experimentos debe realizarse de manera obligada para poder decidir si existe o no la catálisis por la especie estudiada (Jencks WP. 1969)

Otro estudio realizado durante este trabajo fue el efecto del grado de neutralización del catalizador en las diferentes mezclas de DMSO-agua donde hubo catálisis. Esto para conocer las especies involucradas en el mecanismo de acción de la ruptura del HpNPP y con ello determinar la ley de rapidez y el posible mecanismo de reacción (Jencks WP; 1969; Anslyn EV y Perreault DM 1997; Isaacs N. 1987). En consecuencia, con los datos obtenidos en esta fase fue necesario obtener el valor de la constante básica específica (k_{OH}) en cada mezcla de disolvente, con el fin de descartar o considerar la aportación de catálisis por iones hidróxido en la ruptura del HpNPP en conjunto con los catalizadores.

Además, se determinaron los valores de pKa de metforminio, moroxidinio y TBGu en todas las mezclas DMSO-agua estudiados. También se determinó el valor de autoionización del agua (pKw) en las diferentes mezclas de DMSO-agua usadas, las cuales son necesarias para conocer la concentración de iones hidróxido en los diferentes amortiguadores utilizados en los experimentos.

Determinación de los valores de pK_w del agua y de pK_a de metforminio, moroxidinio y TBGu en las mezclas DMSO-agua.

Para iniciar con el trabajo se determinaron los valores de la constante de autoionización del agua (pK_w) en todas las mezclas DMSO-agua utilizadas y bajo las mismas condiciones de los experimentos cinéticos. Esto fue a una temperatura constante de 37 °C con burbujeo continuo de N₂. Todos los experimentos se hicieron ajustando la fuerza iónica a un valor de 100 mM. Los valores de pK_w obtenidos para cada mezcla de disolvente se muestran en la tabla 1, mientras que el comportamiento se muestra en la Figura 15. Se puede observar que en el intervalo observado hay un incremento del valor del pK_w de 3 unidades logarítmicas, siendo más pronunciado el incremento de 70 a 80%.

Tabla 1. Valores de pK_w a 37 °C en las diferentes mezclas de DMSO-agua, *I* = 100 mM.

Porcentaje de DMSO	50%	60%	70%	80%
pK _w	15.3	16.2	17.3	18.8

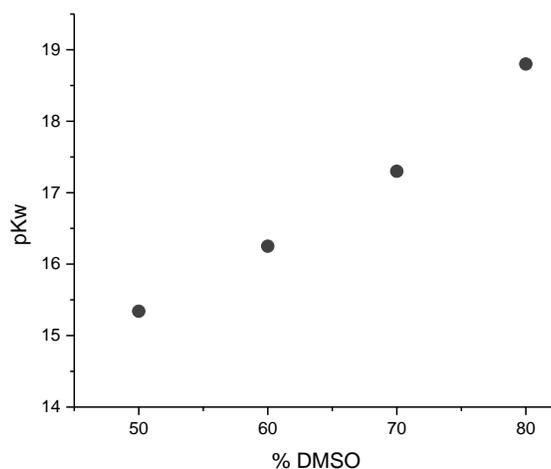


Figura 15. Relación de los valores de pK_w determinados en las mezclas DMSO-agua.

Para hacer un mejor análisis, con los datos de la tabla 1, se hizo una gráfica de la variación del pK_w con relación a la fracción molar de DMSO en la mezcla acuosa, la cual se muestra en la Figura 16. En ella podemos observar el comportamiento lineal que tiene el valor de pK_w con la fracción molar de DMSO. Cualitativamente, se puede observar que a mayor contenido de DMSO

el valor de pKw aumenta. Lo anterior es de esperarse ya que el dimetilsulfóxido es menos polar que el agua y además tiene una permitividad dieléctrica menor. Reducir la permitividad dieléctrica del medio hace que las moléculas de agua se disocien menos y por ello el valor de pKw aumenta (Wolley EM y col. 1970; Cox RA y Stewart R. 1976).

La gráfica fue analizada mediante un ajuste lineal, la ecuación de la recta obtenida fue: $pKw = 11.42 X_{DMSO} + 13.05$, con un valor de r^2 de 0.999. Con el resultado obtenido de la pendiente, el valor de 11.42 nos deja más claro que para cada aumento de 0.1 unidades de la fracción molar de DMSO, el aumento del pKw será de 1.142 unidades. Dicho esto, cabe mencionar que entre mayor sea el contenido de DMSO en el medio, menor será la cantidad de los iones hidrógeno e hidróxido generados por el medio. Tomando en cuenta lo anterior, entre más contenido de DMSO mayor será la posibilidad de ver una catálisis por las bases usadas debido a que la concentración de los iones hidróxido será cada vez menor y su contribución podría llegar a estar muy disminuida.

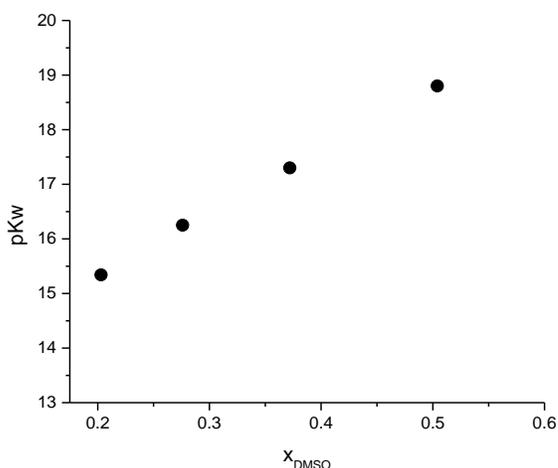


Figura 16. Relación de los valores de pKw determinados en las mezclas de DMSO-agua en función de su fracción molar.

Para poder hacer una correlación entre la actividad catalítica y la fuerza de las bases utilizadas en este trabajo, se determinaron los valores de pKa de los ácidos conjugados (de metformina, moroxidina y TBGu) en las condiciones de trabajo. Además, con este parámetro se pueden conocer las concentraciones de todas las especies ácido-base presentes en los sistemas de reacción. Es importante mencionar que los valores de pKa en las condiciones de trabajo para los ácidos conjugados de los catalizadores no habían sido determinados con anterioridad. Los valores de pKa se determinaron mediante titulaciones potenciométricas. Una vez preparadas las soluciones se agregaron pequeñas alícuotas de soluciones (mezclas DMSO-agua elaboradas en

las mismas condiciones) con hidróxido de tetrametilamonio, con una fuerza iónica (cloruro de tetrametilamonio) de 0.1 M. Todos los experimentos se hicieron a temperatura constante de 37° C. Los valores obtenidos en las mediciones potenciométricas (pH) se corrigieron con la ecuación 5 para su posterior análisis en el programa Hyperquad y con esto se determinó el valor de pKa. En la Figura 17 se muestra la curva de titulación potenciométrica de cloruro de metforminio con los valores de pH corregidos. En la tabla 2 se encuentran los valores de pKa promedio obtenidos en las diferentes mezclas de DMSO-agua que se estudiaron.

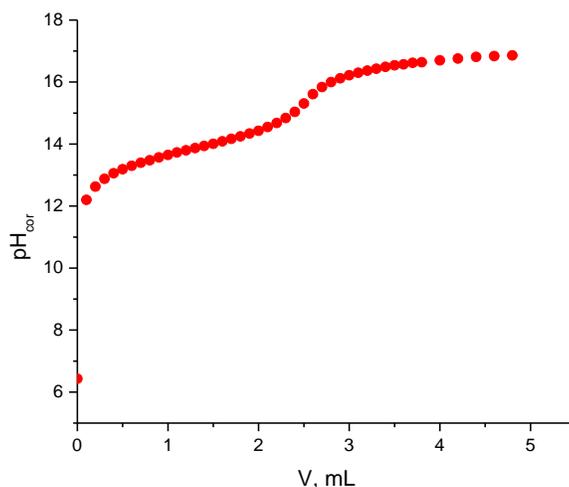


Figura 17. Curva de valoración del cloruro de metforminio a 37°C en la mezcla de 80% DMSO.

Tabla 2. Valores de pKa de metformina a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua.

Porcentaje de DMSO	50%	60%	70%	80%
pKa	13.37(0.93)	13.42(0.50)	13.47(2.29)	13.80(1.86)

De los valores obtenidos para los pKa de metforminio en las mezclas estudiadas, se puede observar que el cambio entre 50 y 70% en volumen es muy pequeño, por lo que podría considerarse que no hay cambio. Sin embargo, al cambiar de 70 a 80% el cambio es de 0.3 unidades logarítmicas. En la Figura 18, se hizo una gráfica de la variación de los valores de pKa en función de la fracción molar del DMSO. En ella se puede observar que, aunque hay un aumento de casi 0.3 unidades en fracción molar, el cambio en los valores de pKa es

prácticamente indetectable. Los resultados anteriores nos llevan a la concluir que el efecto del DMSO en las mezclas no afecta en gran medida el valor de pKa. Esta conclusión es razonable ya que el cloruro de metforminio al disociarse genera metformina (especie neutra) y iones hidrógeno, lo que no genera un cambio significativo en las energías Gibbs de transferencia de fase. Cualquier variación es debida a una pequeña estabilización particular en la estructura química de la forma catiónica en el disolvente (Cox BG. 2013).

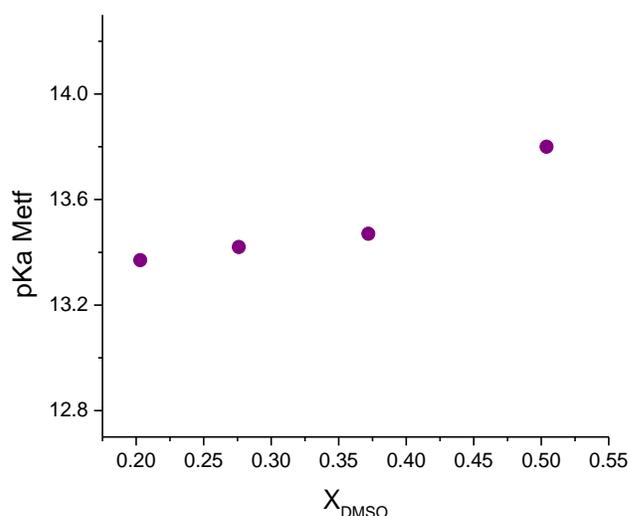


Figura 18. Valores de pKa de metforminio en función de la fracción molar de DMSO.

En el caso de 1-(*o*-Tolil) biguanidío (TBGu), los valores de pKa determinados se muestran en la tabla 3. En la Figura 19 podemos observar un comportamiento similar en la tendencia de los valores de pKa de TBGu a los de metforminio. En este caso, los valores de pKa son 3 órdenes de magnitud menores. Es importante notar que los valores de pKa en el caso de TBGu no tienen cambios notables al aumentar el porcentaje de DMSO. Lo que nos indica que no existe ninguna estabilización en las energías de Gibbs de transferencia de fase extra, en ninguna de las mezclas usadas.

Tabla 3. Valores de pKa de TBGu a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua.

Porcentaje de DMSO	50%	60%	70%	80%
pKa	10.32(0.93)	10.34(1.77)	10.36(4.72)	10.45(4.66)

Finalmente, para completar la serie de ácidos conjugados de las bases estudiadas, se hicieron las titulaciones con moroxidina en 80% de DMSO. El valor de pKa obtenido en la mezcla promedio fue de 13.2 (4.04), valor muy cercano al obtenido para metforminio. De todos los valores que se obtuvieron en las mezclas de DMSO-agua comparados con los valores informados en agua a 25°C, podemos observar cambios pequeños en los valores. En el caso de TBGu al tener una estructura principalmente hidrofóbica, no presenta cambios considerables al aumentar el contenido de DMSO en las mezclas, lo que indica que no hay una estabilización mayor con relación al agua. Es importante mencionar, que los valores obtenidos, comparados con guanidinas y amidinas en mezclas similares (Corona DO 2008, Corona DO 2011, Salvio R y col. 2013, Salvio R y col. 2015) no varían mucho, además de tener las mismas tendencias de poco cambio con relación a los valores informados en agua.

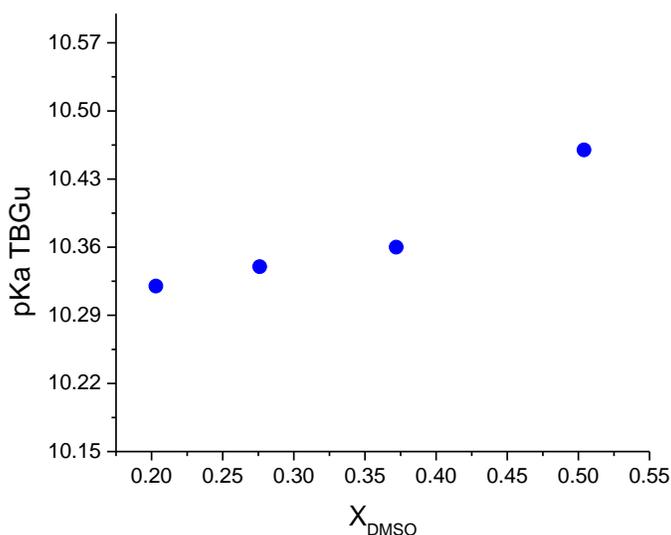


Figura 19. Valores de pKa de la TBGu en función de la fracción molar de DMSO

Efecto de la Hidrólisis Básica Específica

Debido a que en toda catálisis ácido-base es posible la contribución de los iones hidróxido (catálisis básica específica) en las distintas mezclas de disolvente, se determinaron los valores de las constantes de rapidez debido a la catálisis por iones hidróxido. El intervalo de concentración estudiado fue de 0.005 a 0.1 M de iones hidróxido, con un valor de fuerza iónica constante de 0.1 M en cada experimento (Corona DO 2008).

Las constantes de rapidez obtenidas se muestran en la tabla 4 para la variación de la concentración en cada mezcla estudiada. En el intervalo que comprende de un 10 a un 60% de DMSO, los perfiles se ajustaron a un modelo lineal, por lo que los valores para k_{OH} (constante para la catálisis básica específica, $k_{obs} = k_{OH}[\text{OH}^-]$), como se puede ver en la Figura 20. En el intervalo que comprende 70 y 80% de DMSO (Figura 21), los perfiles se tomaron cuadráticos. Para esto se hizo un análisis con una constante aparente de segundo orden ($k_{obs}/[\text{OH}^-]$), con el fin de conocer el valor de k_{OH} . Este comportamiento ya había sido informado por (Corona DO 2008) y se atribuye al incremento del disolvente que repercute en una mayor sensibilidad en la fuerza iónica del medio. Los valores obtenidos para las constantes de la catálisis básica en cada medio se presentan en la tabla 5.

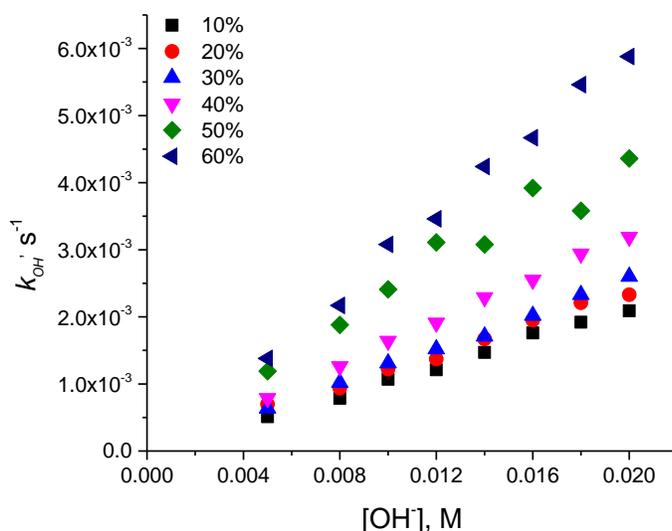


Figura 20. Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio 10-60% en las mezclas DMSO-agua.

Tabla 4. Relación de los valores obtenidos para las constantes de rapidez de la reacción entre HpNPP con iones de hidróxido a 37°C en las diferentes mezclas DMSO-agua con una fuerza iónica controlada de 0.1 M.

	$k_{obs} \times 10^4 \text{ s}^{-1*}$								
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	
0.005	5.106	6.99	6.38	7.85	11.9	13.8			
0.008	7.85	9.370	10.2	12.6	18.8	21.7			
0.01	10.7	12	13.1	16.4	24.1	30.8	52.9	104	
0.012	12.1	13.7	15.2	19.1	31.1	34.6			
0.014	14.7	16.7	17.1	22.9	30.8	42.4			
0.016	17.6	19.5	20.2	25.5	39.2	46.7			
0.018	19.2	22.1	23.3	29.4	35.8	54.6			
0.02	20.9	23.3	26	31.9	43.6	58.8	91.2	221.1	
0.03							151.8	284.7	
0.04							211.1	512.2	
0.05							260.5	573.2	
0.06							327.6	664	
0.07							370.6	695.1	
0.08							415.3	898.6	
0.09							335.7	10000.6	
0.1							512.	1334.6	

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%.

Tabla 5. Constantes de rapidez para la hidrólisis básica específica a 37°C en las mezclas DMSO-agua.

Porcentaje de DMSO	10	20	30	40	50	60	70	80
$k_{OH}, M^{-1} S^{-1}$	0.09	0.1	0.12	0.13	0.15	0.25	0.4	0.6

Así mismo, en la Figura 22 podemos encontrar la gráfica hecha con los datos de la tabla 5, en la cual se puede observar un comportamiento tipo exponencial en los valores de la constante de rapidez para la ruptura del HpNPP mediante una catálisis básica específica. Este aumento es de esperarse ya que conforme aumenta el contenido de DMSO en la mezcla, las interacciones por enlaces de hidrógeno entre el agua y los iones hidróxido se ven disminuidas. Además, la interacción entre el dimetilsulfóxido y los iones hidróxido son de menor magnitud, permitiendo que la base pueda llevar a cabo la reacción de manera más eficiente que sólo en agua.

Con los resultados obtenidos en los diferentes porcentajes de DMSO para la catálisis básica específica, se hizo una gráfica del valor logarítmico de la constante en función del pK_w del medio. El pK_w nos da una medida de la cantidad de iones hidróxido presentes en el medio ($K_w = [H^+][OH^-]$, $pK_w = pH + pOH$). Este tipo de relaciones se conoce como relaciones de Brønsted (Jenks WP 1969, Brønsted JN 1928).

En este caso, existe una correlación lineal en los valores obtenidos con la siguiente ecuación de la recta: $\log k_{OH} = 0.18 pK_w - 3.54$. Este valor de pendiente menor a 0.5 indica que el estado de transición en el caso de la catálisis básica específica es temprano, lo que significa que se parece más a los reactivos que a los productos. En el caso de la catálisis básica general los valores de las pendientes de este tipo de gráfico son mayores de 0.5 (Sánchez-Lombardo I, Yatsimirsky AK. 2008, Corona DO. 2008) esto es un indicativo de un posible cambio en el mecanismo de reacción en relación con la catálisis básica general, como se ha informado por evidencias con efectos isotópicos de disolvente (Corona DO y col. 2012). El posible mecanismo mediante el cual ocurre la reacción de ruptura del HpNPP con el ion hidróxido, posiblemente involucre primero una desprotonación y después el ataque del grupo alcóxido formado, como se muestra en la Figura 23.

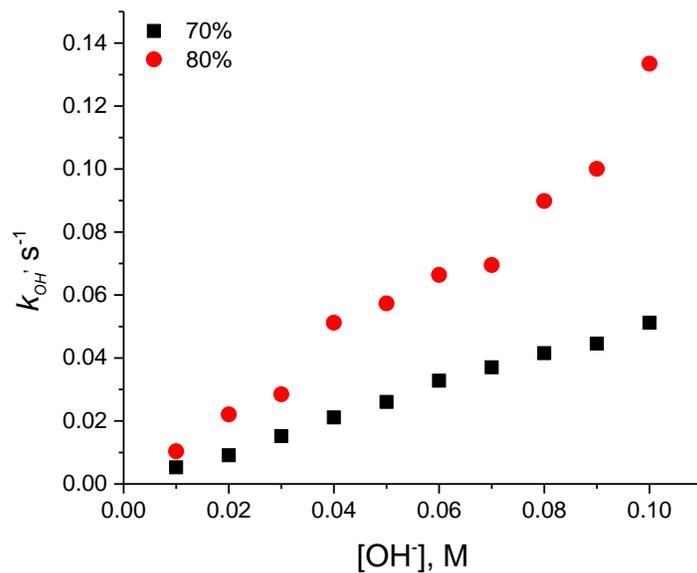


Figura 21. Dependencia de las constantes de rapidez con la concentración de hidróxido de tetrametilamonio 70 y 80% en las mezclas DMSO-agua.

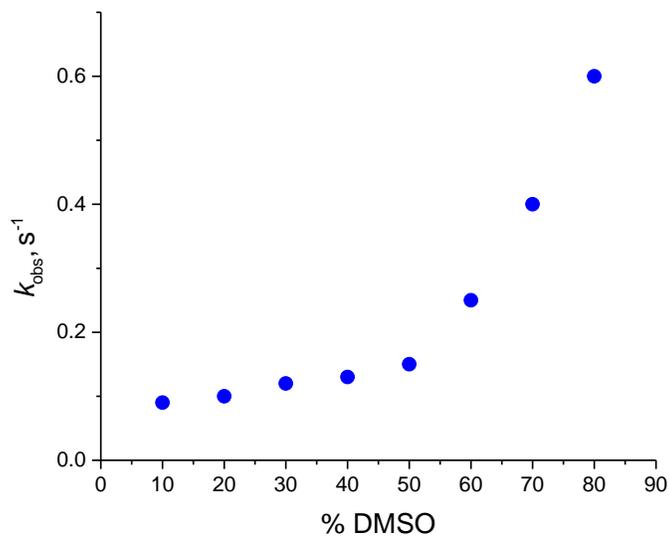


Figura 22. Variación de las constantes de rapidez básica específica contra el porcentaje de DMSO.

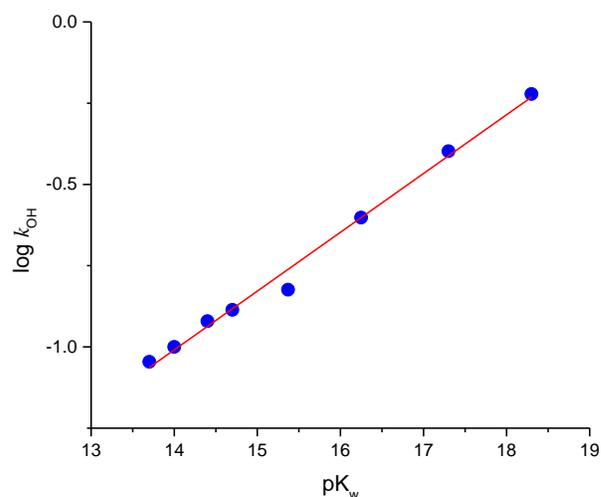


Figura 23. Variación del log k_{OH} en función del pK_w del medio, comúnmente llamada correlación de Brønsted.

Efecto de la Concentración Total del Amortiguador

Una de las partes fundamentales de este trabajo fue comprobar si la metformina, la moroxidina y la TBGu eran capaces de efectuar una ruptura de tipo ácido-base en la reacción de transesterificación del HpNPP. El experimento se realizó mediante la variación de la concentración del amortiguador en cada mezcla de DMSO-agua con una proporción de neutralización fija del 50%. En este porcentaje se tiene la presencia en cantidades equimolares de las dos especies del amortiguador (HMetf⁺/Metf) y, además, justo en esa proporción el valor de pH del amortiguador es igual al pKa. Lo anterior lo podemos confirmar con la ecuación de Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{Gu}]}{[\text{HGu}^+]} \right)$; si $[\text{Gu}] = [\text{HGu}^+]$, entonces tenemos que: $\log \left(\frac{[\text{Gu}]}{[\text{HGu}^+]} \right) = 0$ y $\text{pH} = \text{pKa}$. Este experimento es de suma importancia ya que al mantenerse fijo el valor de pH (porcentaje de neutralización fijo), se puede descartar la posible contribución de los iones hidróxido (Jencks WP 1969).

En todos los experimentos se utilizaron condiciones de pseudoprimer orden en relación con el sustrato ($[\text{HpNPP}] = 20 \mu\text{M}$) (Jencks WP 1969). El amortiguador se generó a partir de las concentraciones adecuadas entre la forma protonada del catalizador (cloruro de metforminio, cloruro de moroxidinio, TBGu según el experimento) y el hidróxido de tetrametilamonio. La

concentración total del amortiguador se hizo variar desde 0.02 hasta 0.1 M y en todos los casos se mantuvo constante la fuerza iónica con cloruro de tetrametilamonio en un valor de 0.1 M. Los valores de las constantes de rapidez de obtuvieron mediante un ajuste no lineal con la ayuda de la ecuación mencionada en la sección de materiales y métodos.

Al probar metformina bajo las condiciones mencionadas, encontramos que sí existe un efecto catalítico en cada uno de los porcentajes estudiados de DMSO agua. Esto lo podemos asegurar debido a que el valor de pH en todo el experimento se mantiene constante y por ende no hay catálisis por los iones hidróxido. En la tabla 6 se encuentran los valores de las constantes de rapidez obtenidas. En las Figuras 24 y 25 se encuentran las gráficas de los perfiles obtenidos para las mezclas de DMSO de 50 y 60, y para 70 y 80% respectivamente. En los perfiles podemos observar que tanto en 50 y 60% se tiene una dependencia lineal, es decir, la catálisis es de primer orden respecto a la metformina. Lo anterior nos indica que el mecanismo de la reacción catalizada se lleva a cabo con una especie de metformina, ya que la ley de rapidez es del tipo $k_{obs} = k_{Metf}[Metf]_T + k_0$. En este experimento no podemos discriminar si la especie que participa es la protonada o la desprotonada.

Tabla 6. Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (metformina) de acuerdo al porcentaje de DMSO.

[Metf] _T , mol/L	$k_{obs} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$			
	50%	60%	70%	80%
0.02	111	43.0	6.8	1.8
0.04	146	51.5	9.6	2.1
0.05	158			
0.06	179	58.0	13.0	2.9
0.07	191			
0.08	212	65.8	14.1	3.6
0.1	246	72.9	18.0	4.7

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%

En la Figura 25, podemos ver que en 80% de DMSO tiene un comportamiento ligeramente cuadrático, el cual podría deberse a una participación de dos especies del amortiguador en el mecanismo. También puede deberse a un efecto diferente, por lo que los perfiles de neutralización son muy importantes. Por ende, en la siguiente sección de los perfiles de neutralización se hará un análisis más detallado que permita discriminar entre varias posibilidades.

Otro de los compuestos a probar del grupo de las biguanidas es la moroxidina, un compuesto actualmente utilizado como un potencial antiviral de uso veterinario que lo podemos encontrar en el mercado como Virustad®, Moxid®. El compuesto se utiliza contra virus de tipo ADN y ARN (como herpes zoster, virus de la influenza, virus del moquillo). Está biguanida tiene un particular interés en el presente trabajo, debido a que es de uso comercial y ataca virus de ARN y como el sustrato que se utiliza es modelo del ARN, la posibilidad que pueda hidrolizar la molécula abre posibilidades hacia una posible explicación del mecanismo de acción.

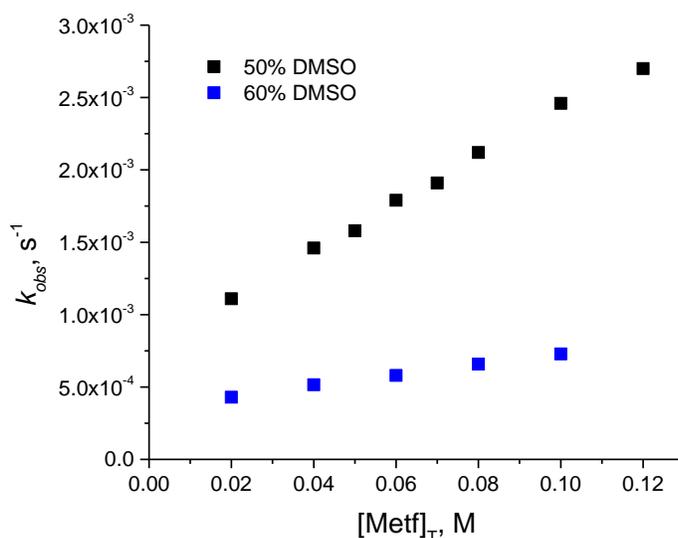


Figura 24. Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con metformina a 37°C en las mezclas DMSO-agua, 50 a un 60%.

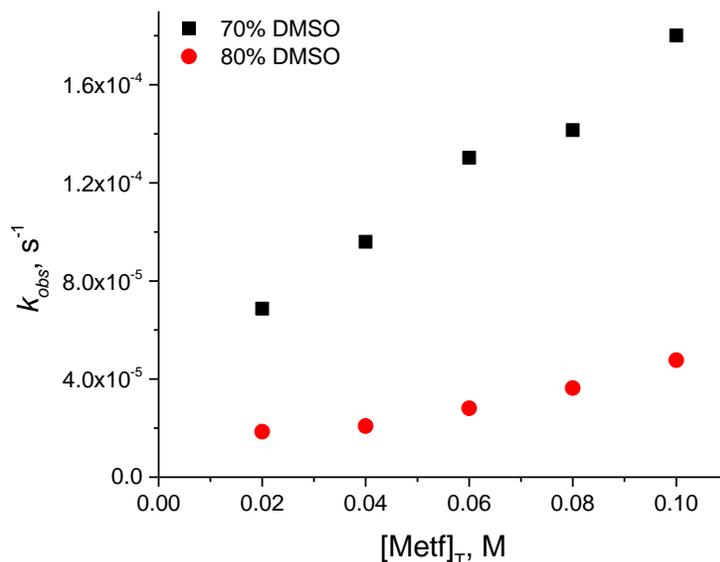


Figura 25. Perfiles de concentración en la catálisis del HpNPP con metformina a 37°C en las mezclas DMSO del 70 al 80%.

Debido a que en 80% de DMSO, se tienen una menor cantidad de iones hidróxido (ver resultados obtenidos en las determinaciones de pK_w del medio), se decidió hacer la comparación sólo en este porcentaje de la mezcla de disolvente. Lo anterior permitirá una menor competencia por la catálisis básica específica, lo que hará posible, en caso de existir, observar una catálisis por la moroxidina. Los experimentos del perfil de concentración se realizaron como se ha mencionado con anterioridad. En la tabla 7, se encuentran los valores promedio obtenidos en los experimentos hechos del perfil de concentración y en la Figura 26 se muestra la gráfica de los mismos.

Tabla 7. Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (moroxidina) en 80% DMSO.

[Morx] _T , mol/L	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
$k_{obs} \times 10^6 \text{ s}^{-1}$	6.54	8.22	12.50	17.67	21.85

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%

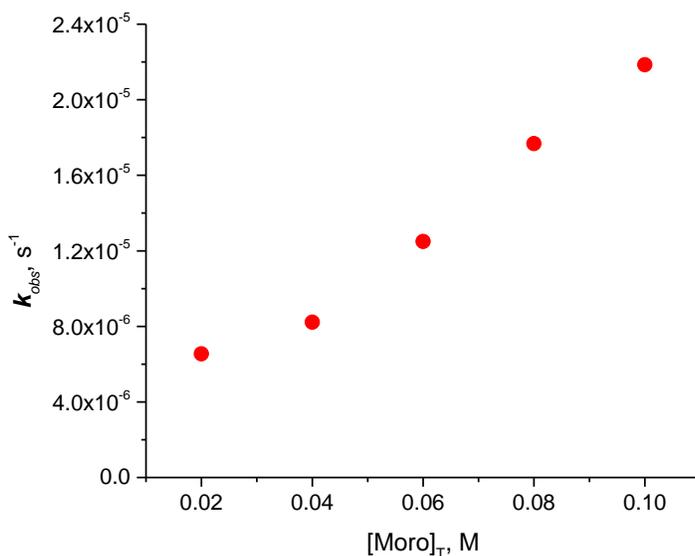


Figura 26. Perfil de concentración en la catálisis del HpNPP con moroxidina a 37°C en la mezcla DMSO al 80%.

En la Figura 26, el perfil muestra también una ligera curvatura dando la posibilidad de un mecanismo cuadrático que en los experimentos de perfiles de neutralización se podrá confirmar o descartar. De nueva cuenta el perfil tiene un intercepto diferente de cero. Esto significa que el incremento en el efecto catalítico con relación a la constante debido al medio (al pH que se mantuvo constante la reacción) es pequeño pero significativo. Este resultado es muy importante porque se demuestra que este fármaco puede hidrolizar un sustrato modelo del ARN, lo cual puede significar que la forma de actuar del fármaco posiblemente sea mediante la hidrólisis del ARN del virus, impidiendo que este se replique. Es evidente que harían falta más experimentos con cadenas de ARN o al menos con dinucleótidos, sin embargo, el hecho que pueda romper un modelo del ARN es un buen indicativo de que esta sea su forma de actuar.

Para completar la serie, se utilizó otra biguanida comercial, la 1-(*o*-Tolil) biguanida (TBGu). Un aspecto importante de este compuesto es que, a diferencia de los otros dos de la familia, presenta un impedimento estérico fuerte en su estructura, lo que podría permitir hacer inferencias con la relación actividad-estructura. Los valores de las constantes de rapidez obtenidas para la ruptura del HpNPP en el experimento del perfil de concentración con TBGu se muestran en la tabla 8. Al realizar una gráfica de estos datos (ver Figura 27) se puede observar que, aunque sí

hay catálisis, no existe una posible contribución cuadrática. Esto puede deberse en gran medida a la estructura de TBGu que posee un impedimento estérico. Así mismo, al igual que en los casos anteriores el intercepto de esta gráfica es diferente de cero, dando un indicativo de nuevo que el efecto catalítico existe, pero es pequeño. Un aspecto a resaltar con TBGu es que las reacciones son más lentas, lo que puede deberse a su valor de pKa (correlación actividad-estructura), además del impedimento estérico que presenta la molécula. Esto último es de particular importancia, ya que presenta efecto catalítico a diferencia de otros compuestos impedidos como la tetrametilguanidina (Corona DO 2008).

Tabla 8. Valores obtenidos para las constantes de rapidez en función de la concentración del amortiguador (TBGu) en 80% DMSO.

	[TBGu] _T , 80% DMSO				
mol/L	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
$k_{obs} \times 10^7 \text{ s}^{-1}$	6.5	11.1	15.6	30.1	33.8

*El porcentaje de error para las constantes fue menor a 1%

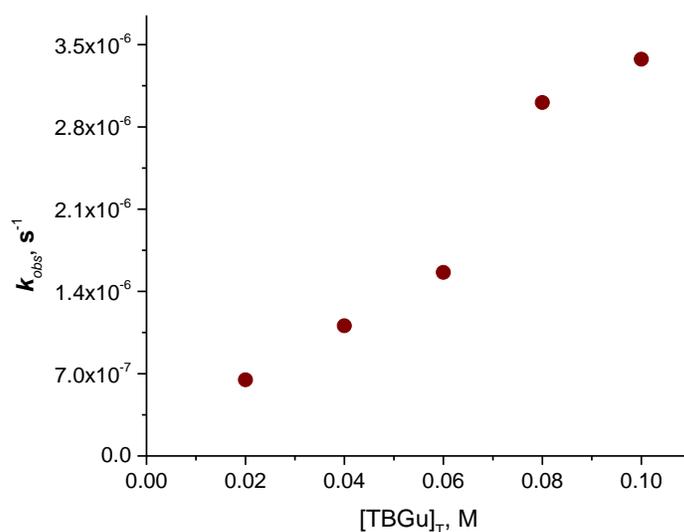


Figura 27. Perfil de concentración en la catálisis del HpNPP con TBGu a 37°C en la mezcla DMSO al 80%.

Efecto del Grado de Neutralización del Amortiguador

En la actualidad existen grupos que realizan estudios con moléculas derivadas de guanidinos en condiciones similares a las del presente trabajo (Salvio R y col. 2013; Kirby AJ y col. 2009). En ellos se busca evaluar el efecto de tener dos guanidinos, uno en su forma protonada y otro desprotonado para favorecer un mecanismo bifuncional. En ellos se han evaluado los efectos de los espaciadores y de otros grupos. Aunado a lo anterior, en conjunto con los trabajos realizados en el grupo de trabajo con guanidinas y otros amidinios (Corona DO 2010, Corona DO 2012), se buscó el efecto que tiene la basicidad de las biguanidas y la estructura en su actividad. En los trabajos resultó importante la participación de ambas especies en la mejora de la actividad catalítica. Esto es importante mencionar, ya que la inspiración del trabajo de las biguanidas es la fusión de dos guanidinas en la estructura, lo que podría potenciar la actividad catalítica o permitir inferir una posible explicación a los mecanismos de acción de los fármacos derivados de estas estructuras.

Después de obtener los resultados en el efecto de concentración del amortiguador, se realizaron perfiles de variación de la neutralización del amortiguador de un 10 hasta un 90% en cada una de las mezclas DMSO-agua utilizadas para la reacción de ruptura del HpNPP con los diferentes catalizadores utilizados. En todos los experimentos se mantiene constante la concentración total del amortiguador en 0.1 M. Los experimentos de perfil de neutralización del amortiguador ayudan a conocer qué especie del amortiguador tiene mayor participación en la catálisis. Los datos obtenidos de las constantes de rapidez para la metformina en las mezclas de disolvente de 50 a 80% se muestran en la tabla 9.

En la Figura 28 se muestran las gráficas del perfil de neutralización para la metformina. En las gráficas, podemos observar un comportamiento lineal en los perfiles que se realizaron en 50 y 60% de DMSO-agua. En tanto que los perfiles de 70 y 80% de DMSO podemos observar una ligera curvatura. Esto puede deberse a las contribuciones simultáneas de todas las especies presentes en el medio: iones hidróxido (catálisis básica específica), metformina libre (catálisis básica general), ion metforminio (catálisis ácida general) y el disolvente también puede estar participando; e incluso por la combinación de alguna de ellas.

Tabla 9. Dependencias de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la metformina en la transesterificación del HpNPP a 37°C en función del porcentaje de DMSO.

[Metf] _L , mol/L	$k_{obs} \times 10^5 \text{ s}^{-1}$			
	50%	60%	70%	80%
0.01	29.94	33.13	3.80	1.54
0.02	63.27	80.43	6.84	1.88
0.03	103.0	125.0	10.89	2.60
0.04	197.0	178.0	13.96	3.07
0.05	263.0	224.0	20.59	3.79
0.06	325.0	322.0	26.09	4.59
0.07	418.0	385.0	32.34	6.62
0.08	551.0	469.0	51.50	10.87
0.09	322.0	578.0		

*El porcentaje de error para las constantes fue menor al 1%.

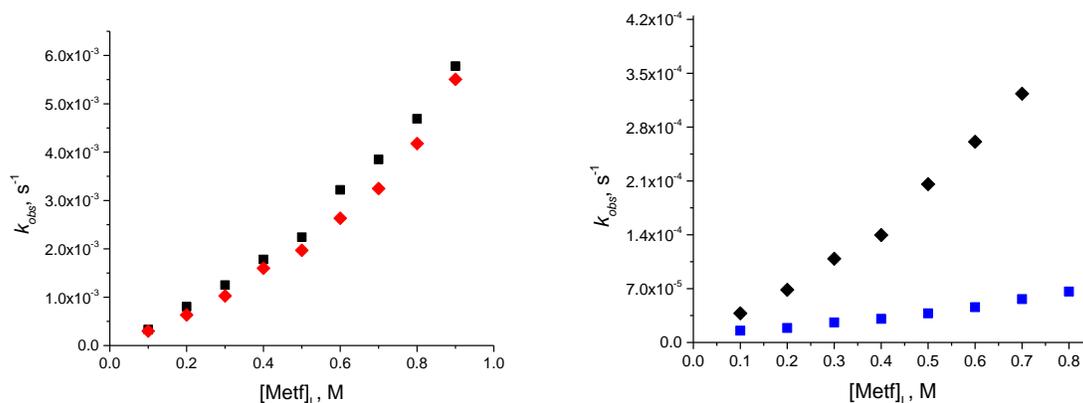


Figura 28. Perfil de variación de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de la metformina en: (a) 50 y 60% y (b) 70 y 80%.

En el caso de moroxidina, para el perfil de neutralización que nos permite aclarar qué especies están involucradas en la catálisis, los valores obtenidos para las constantes de rapidez se encuentran en la tabla 10 y la gráfica de los mismos se muestra en la figura 29. Como se mencionó en el efecto del catalizador, los resultados corresponden únicamente a la mezcla de 80% que dio mejores resultados con metformina. Al realizar, la gráfica con estos valores se encontró un comportamiento similar al de 70 y 80% de DMSO con metformina, es decir un perfil

cuadrático que puede deberse a los mismos efectos en el medio, sin embargo, las constantes de rapidez resultaron ser de menor valor. Este resultado, es interesante ya que involucra un efecto catalítico debido a la forma básica de la biguanida de manera principal con otras contribuciones que serán analizadas más adelante con los resultados de los demás catalizadores utilizados (*vide infra*).

Tabla 10. Dependencia de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de la moroxidina en la transesterificación del HpNPP a 37°C en 80% DMSO.

[Morx] _L , mol/L	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
$k_{obs} \times 10^5, s^{-1}$	1.16	1.46	1.52	1.83	2.38	2.85	3.16	4.33

*El porcentaje de error para las constantes fue menor al 1%.

Finalmente, los resultados con la TBGu, se muestran en la tabla 11 y la gráfica de los mismos se muestra en la Figura 30. A diferencia de las otras dos bases, el comportamiento en el perfil de neutralización es lineal, sin ninguna curvatura aparente. Esto tiene mucho sentido debido a que el catalizador tiene impedimento estérico que complica la participación de dos especies, lo que indica que el perfil lineal está relacionado con una sola especie de la base, tal como se encontró en el perfil de concentración. En general, el comportamiento mostrado en cada una de las biguanidas muestra una similitud entre la moroxidina y la metformina, ambas presentan una curva en el perfil de neutralización a diferencia de la TBGu la cual presenta un comportamiento más lineal.

Tabla 11. Dependencia de la constante de la rapidez con el grado de desprotonación de la TBGu en la transesterificación del HpNPP a 37°C en 80% DMSO.

[TBGu] _L , mol/L	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
$k_{obs} \times 10^6 s^{-1}$	1.83	2.94	3.10	4.30	3.86	4.09	4.46	

*El porcentaje de error para las constantes fue menor al 1%.

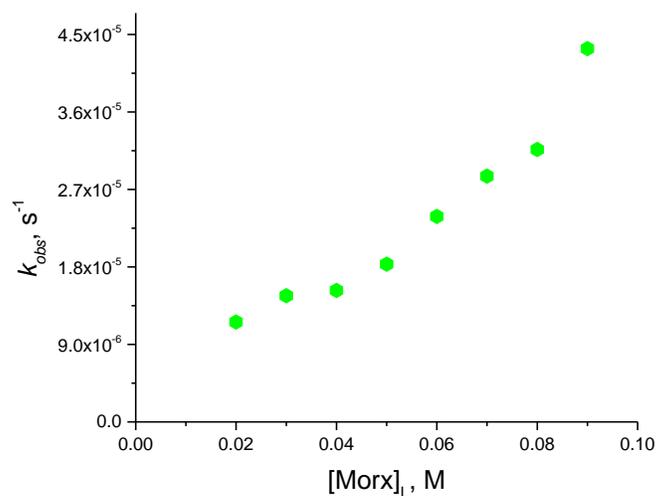


Figura 29. Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la moroxidina en 80% DMSO.

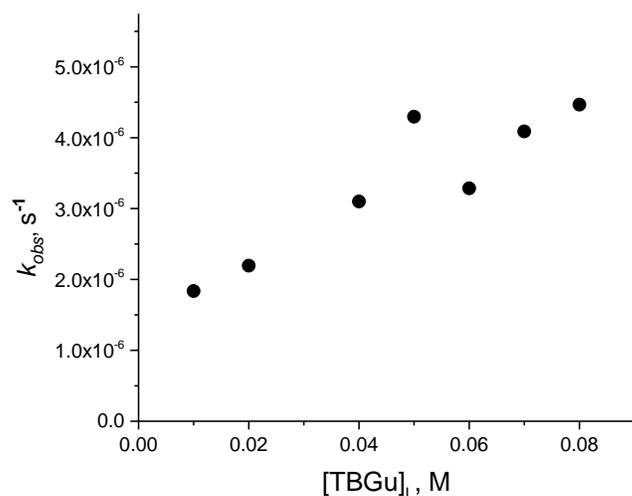


Figura 30. Perfil de la variación de la constante de rapidez con el grado de desprotonación de la TBGu en 80% DMSO.

Debido a la posibilidad de tener una contribución por iones hidróxido y las dos especies de las bases usadas, para discriminar entre varias rutas se requiere considerar la ecuación canónica de la catálisis ácido-base propuesta por (Brønsted 1928; Jencks WP. 1969; Laidler KJ. 1987; Kwan EE. 2005), donde se consideran todas las especies participantes en el mecanismo. Con los experimentos ya analizados (*vide supra*), podemos deducir que las especies que están

participando en la reacción de ruptura en las condiciones que se establecieron son los iones hidróxido, la base libre y la combinación de la base libre con su forma protonada en la siguiente ecuación de rapidez:

$$k_{obs} = k_1[B] + k_2[B][HB^+] + k_{OH}[OH^-] \quad \text{Ec. 6}$$

En todos los casos, debido a la posibilidad de la contribución de la catálisis básica específica, se hizo la corrección restando su contribución a la constante de rapidez observada. Lo anterior se puede hacer con los valores determinados de la catálisis básica específica en cada mezcla. Para conocer la concentración de iones hidróxido en cada una de las fracciones del amortiguador se tuvo que recurrir a la ecuación sin aproximaciones de la constante de equilibrio ácido-base para las bases para los porcentajes de DMSO de 50, 60 y 70%. Esto es porque los valores de pKa y del pKw son muy cercanos y las aproximaciones conocidas que generan la ecuación de Henderson-Hasselbach para disoluciones amortiguadoras no son válidas (Charlot G. 1980). En 80%, debido a la diferencia de 5 unidades en los valores de pKa y pKw sí es válido usar la ecuación de Henderson, por lo que es la que se usará en los cálculos con todos los catalizadores. La ecuación general del cálculo de la concentración, cuando se toma en cuenta el balance de carga y el de materia de las especies involucradas en el equilibrio, es:

$$[H^+] = \frac{K_a([HB^+] - [H^+] + [OH^-])}{[B] + [H^+] - [OH^-]} \quad \text{Ec 7}$$

La cual, al despejarse para calcular la concentración de ion hidrógeno, queda como:

$$[H^+]^3 + \{[B] + K_a\}[H^+]^2 - \{K_w + K_a[HB^+]\}[H^+] - K_aK_w = 0 \quad \text{Ec. 8}$$

Con la concentración de hidrógeno y considerando el valor de Kw y su expresión, Kw = [H⁺][OH⁻], podemos calcular las concentraciones de iones hidróxido. La resolución de la ecuación cúbica que se empleó fue por el método algebraico, haciendo un algoritmo en Excel para poder hacer el cálculo más rápido. No se utilizó el método de Newton-Rapson por ser más elaborado para calcular tantos datos, al basarse en aproximaciones.

Con el valor calculado de la concentración para los iones hidróxido y los valores de la constante de la catálisis básica específica para cada porcentaje en volumen de DMSO (ver tabla 12) se hizo la siguiente operación para el tratamiento de los datos obtenidos:

$$k_{cor} = k_{obs} - k_{OH}[OH^-] = k_2[B][HB^+] + k_1[B] \quad \text{Ec. 9}$$

La ecuación anterior nos permite descartar la contribución básica específica en cada una de las mezclas. En la Figura 31, se muestran los casos de 50 y 80% de DMSO. En la parte a de la Figura se muestra el perfil en 50% de DMSO, el cual presenta una buena contribución por la catálisis por OH, lo que se puede observar en la disminución de la k_{corr} en relación con la k_{obs} . Además, es posible ver que la curvatura desaparece en la corrección.

Esto se debe a la presencia de la contribución de los iones OH⁻ que al aumentar la proporción de la forma básica aumentan notablemente. En el caso de la parte de la Figura 31b, podemos ver que en la mezcla de 80% de DMSO, la contribución por iones OH⁻ es menor, sin embargo, está presente. Además, al igual como se ve en el 50% de DMSO la curvatura del perfil se pierde. Lo mismo ocurre en 60 y 70%, por lo que se resumió este comportamiento con los extremos.

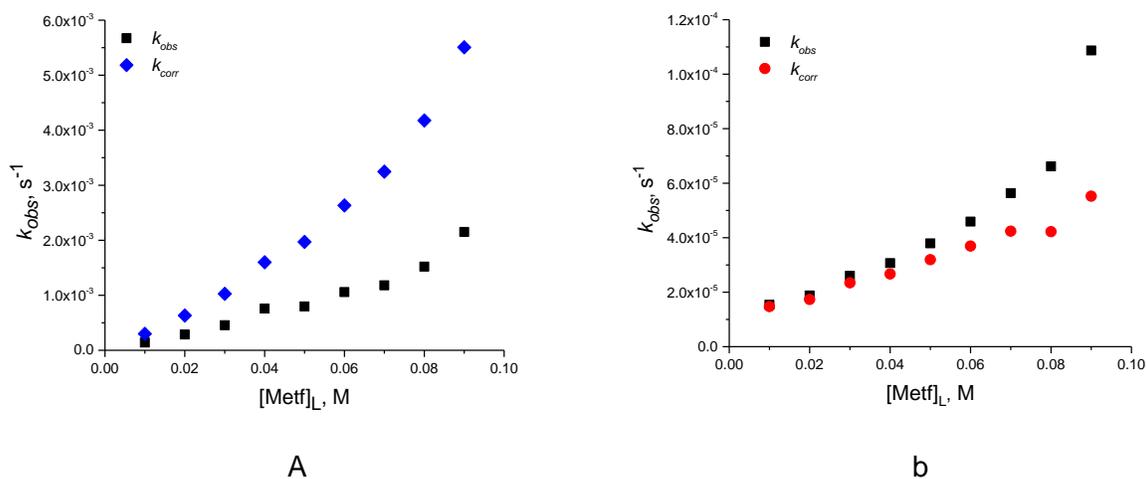


Figura 31. Perfiles de neutralización (k_{obs}) de metformina comparado con el perfil corregido (k_{corr}) (a) en 50% de DMSO y (b) en 80% de DMSO.

Como podemos ver, la curvatura en los perfiles de concentración que podrían sugerir un posible segundo orden en el mecanismo de reacción queda descartados con este experimento. Esto es porque en el perfil de neutralización se encontró un perfil lineal que sólo depende de la concentración de la forma libre del catalizador, es decir, tenemos una catálisis básica general por metformina solamente. Sin embargo, este resultado es realmente importante, ya que, aunque no se tiene una catálisis bifuncional como en sistema bisguanidinos, se encontró que la metformina puede catalizar la ruptura del sustrato modelo del ARN. Esto es importante ya que es la primera vez que se informa acerca de este tipo de comportamiento que podría ser fundamental en la comprensión del mecanismo de acción de este fármaco a nivel molecular. Una vez hechas las

correcciones en cada porcentaje se calcularon las constantes para la catálisis básica general, como se muestra en la Figura 32. En ella se muestra un ejemplo del análisis, el valor de la pendiente de la gráfica corresponde al valor de la constante de rapidez, si consideramos la siguiente ecuación:

$$k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] = k_1[\text{Metf}] + k_0 \quad \text{Ec. 10}$$

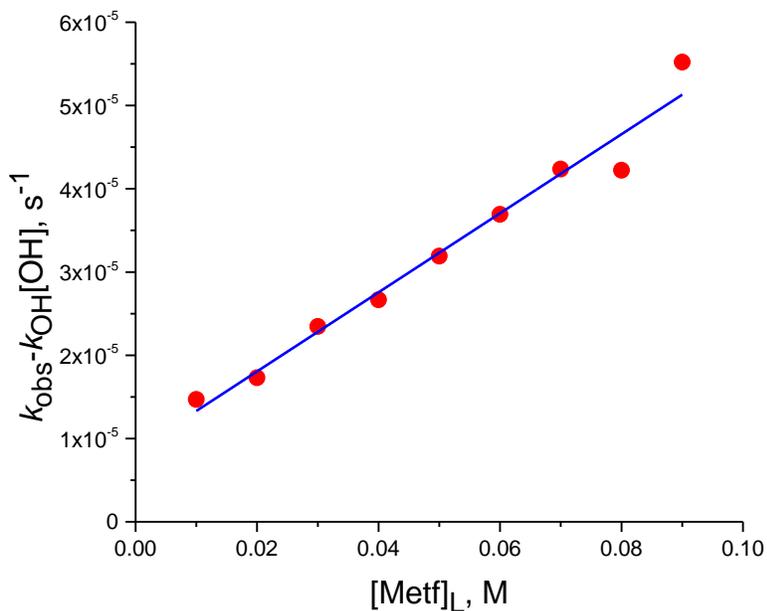


Figura 32. Perfil de neutralización en 80% de DMSO para la ruptura del HpNPP con metformina.

El análisis mostrado anteriormente, se aplicó a moroxidina y TBGu. En el caso de moroxidina, la curvatura del perfil también se pierde y en el caso de TBGU no hubo mayor corrección, ya que el perfil era lineal y la contribución de la catálisis básica específica es mucho menor. Los valores obtenidos para cada constante básica general de cada uno de los catalizadores se encuentran en la tabla 12. Es importante mencionar que en todos los casos se determinó el valor $k_{\text{cor}}/k_{\text{OH}}$, obteniéndose valores mayores a 80% de DMSO que en otros porcentajes. Lo que reafirma la elección de este medio para poder medir la contribución de la catálisis básica general.

Tabla 12. Constantes de la catálisis básica general de cada catalizador en las mezclas utilizadas.

	Metf				Mor	TBGu
%DMSO	50	60	70	80	80	80
$k_B \times 10^4, \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	194	430	30	4.75	4.02	0.37

Con los valores obtenidos de pKa para los catalizadores en la mezcla de 80% de DMSO y las constantes de rapidez, se hizo una gráfica para ver si existe una correlación entre la estructura (el valor de pKa está relacionado con efectos de los sustituyentes) y la reactividad como catalizador. La gráfica se muestra en la Figura 33, en ella aparecen dos puntos más que corresponde a los datos obtenidos por Corona y colaboradores (2010) para la catálisis básica general de piperidina y metilamina, sólo por comparación con sistemas de ácidos catiónicos. Como podemos observar existe una correlación, la ecuación de la recta es $\log k_B = 0.41\text{pKa} - 8.82$.

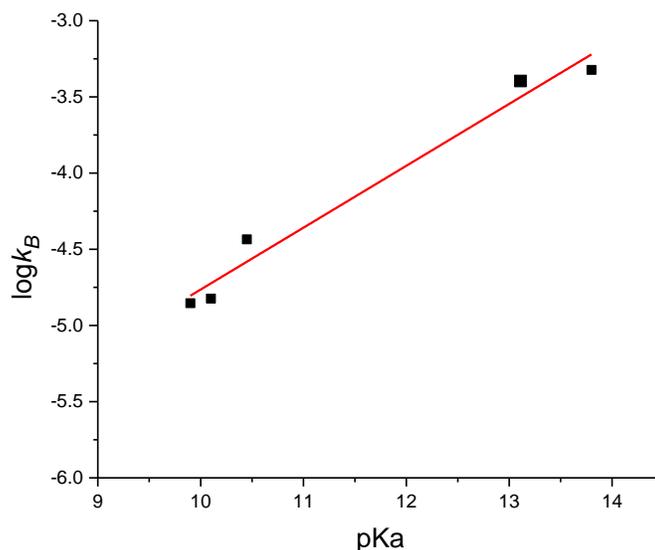


Figura 33. Relación entre las constantes cinéticas y los valores de pKa de los catalizadores utilizados.

El valor de la pendiente de este gráfico tiene dos significados. El primero, en el caso de las biguanidas, la catálisis básica general es poco selectiva con relación a las bases utilizadas, ya que un cambio de pKa en dos unidades apenas genera un cambio de un orden de magnitud

en la constante cinética. Esto es de suma importancia, ya que habla de la capacidad del grupo biguanidío sin importar el sustituyente en la hidrólisis de sustratos de tipo diéster de fosfato. La evidencia anterior, puede usarse para generar estudios in vitro para probar diferentes biguanidas que puedan usarse ya sea como antivirales o, si la vía de señalización inicial en la que participa la metformina involucra una desfosforilación, ampliar la variedad de usos que pueda darse a la metformina en otros padecimientos, si estos involucran la misma vía de señalización inicial. El segundo significado, tiene relación con el estado de transición ya que este valor de pendiente implica que la ruptura de los enlaces y formación de los nuevos no es tan representativa en el mismo, por lo que el estado de transición se parece más a los reactivos (Isaacs N. 1987).

Al tomar todas las evidencias mostradas en este trabajo, donde se evaluaron tres diferentes biguanidas podemos ver que las tres tienen actividad catalítica en la ruptura del diéster de fosfato que se utilizó. En el caso de metformina, es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la Diabetes Mellitus y recientemente se ha encontrado que puede utilizar para tratar el cáncer de mama y el lupus. El presente trabajo puede abrir una ventana en donde a partir de la búsqueda de la vía de señalización inicial que activa la participación de este fármaco se pueden encontrar otros padecimientos donde pueda ser utilizado. Así mismo, se utilizó moroxidina que es el componente activo de antivirales de uso veterinario. El hecho de que el compuesto presente actividad diesterolítica puede ser una evidencia que el mecanismo de acción del fármaco (que no se conoce claramente), ocurra mediante la ruptura del ARN de los virus. Además, se conocen otras biguanidas como la clorhexidina y la clorguanida, usadas una como antiséptico en hospitales y en consultorios odontológicos y la otra como tratamiento contra la malaria. En el caso de la primera podría actuar de manera similar a la moroxidina inactivando microorganismos evitando su replicación. En el caso de la segunda se sabe que inhibe la folatodeshidrogenasa, la cual utiliza NADPH, el cual es un diéster y este podría romperse evitando así la reacción de reducción de la molécula de folato, inhibiendo así la reproducción del parásito.

CONCLUSIONES

Se determinaron los valores de pK_w en las mezclas de DMSO-agua a 37°C de 50 a 80%. Los valores oscilaron entre 15 y 18 y se ajustaron a la línea recta en función de la fracción molar del disolvente $pK_w = 11.42 (0.17) X_{DMSO} + 13.05 (0.06) (4, r^2 = 0.999)$.

Los valores de pK_a determinados para metformina de 50 a 80% de DMSO acuoso variaron de 13.37 a 13.8, mientras que los de TBGu variaron de 10.32 a 10.45 y el obtenido para moroxidina a 80% fue de 13.2.

Se midieron los valores para la catálisis básica específica de la ruptura del HpNPP de 10 a 80% de DMSO-agua. La constante de rapidez en cada medio varió de 0.09 a 0.6 $M^{-1} s^{-1}$. Además, se encontró una correlación entre el logaritmo de la constante básica específica y el pK_w del medio con la siguiente ecuación: $\log k_{OH} = 0.18(0.01) pK_w - 3.54(0.10) (8, 0.991)$.

En el perfil del efecto de DMSO-agua sobre la catálisis con metformina en la ruptura del HpNPP, se encontró que disminuía la constante de rapidez observada al aumentar el contenido de DMSO. Sin embargo, debido al efecto de disolvente sobre el pK_w y el pK_a los porcentajes elegidos fueron de 50 a 80% de DMSO, siendo la mejor para el estudio la mezcla de 80%, por el bajo contenido de iones OH^- .

En todas las mezclas estudiadas se encontró la existencia de la catálisis básica general por parte de metformina, moroxidina y 1-(o-tolil)biguanida, a partir de los experimentos del perfil de concentración.

Para todas las bases utilizadas, en las diferentes mezclas estudiadas, se encontró la siguiente ley de rapidez: $k_{obs} = k_B[B] + k_{OH}[OH^-] + k_0$. En 80% de DMSO los valores de k_B fueron 4.75×10^{-4} , 4.02×10^{-4} y $3.70 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$, para metformina, moroxidina y TBGu, respectivamente. Además, se encontró una correlación con fuerza de los catalizadores con la siguiente ecuación: $\log k_B = 0.41(0.04) pK_a - 8.82(0.43), (5, 0.968)$. Esta correlación indica la baja selectividad o dependencia con la fuerza de la base.

Finalmente, en este trabajo se informa por primera vez la capacidad catalítica del tipo ácido-base de biguanidas en la ruptura de ésteres de fosfato. Lo anterior abre posibilidades en el estudio de mecanismo de acción de fármacos derivados de biguanidas donde se involucren ésteres de fosfato.

BIBLIOGRAFÍA

Adams LA, Angulo P. 2006. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 82: 315-322.

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A y Angulo P. 2005. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population based cohort study. *Gastroenterology*. 129(1): 113–121.

Angulo P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine* 346: 1221–1231.

Anslyn EV y Perreault DM. 1997. Unifying the current data on the mechanism of cleavage - transesterification of RNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 432-450.

Bravo I, Moreno CA, Posadas I, Albalarejo J, Carillo Hermosilla F, Ceña V, Garzón A, López Solera I y Romero Castillo L. 2016. Phenyl-guanidine derivatives as potential therapeutic agents for glioblastoma multiforme: catalytic syntheses, cytotoxic effects and DNA affinity. *RSC. Adv.* 6: 8267-8276.

Bodmer M, Meier C, Krahenbuhl S, Jick S y Meier CR. 2008. Metformin, sulfonylureas, or other antidiabetes drugs and the risk of lactic acidosis or hypoglycemia: a nested case–control analysis. *Diabetes Care* 31: 2086–2091.

Brønsted JN. 1928. Acid and base catalysis. *Chem. Rev.* 5 (3): 231-338

Brown DM y Usher DA. 1965. Hydrolysis of hydroxyalkyl phosphate esters: effect of changing ester group. *J. Chem. Soc.* 6558-6564.

Browning JD y Horton JD. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147–52.

Charlot G. 1980. *Química Analítica General*. Tomo 1. Ed. Toray- Masson. New York. NY.

Carey FA y Sundberg RJ 2007. *Advanced Organic Chemistry*. 5 edition. Part A: Structure and mechanisms.

Corona DO. 2008. *Catálisis con amortiguadores en la hidrólisis de un fosfodiéster modelo del ARN en mezclas DMSO- Agua*. Tesis de Maestría. UNAM.

Corona DO, Taran O y Yatsimirsky AK. 2010. Mechanism of General Acid-Base Catalysis in transesterification of RNA Model Phosphodiester Studied With Strongly Basic Catalysts. *Org. Biomol. Chem.* 8: 873-880.

Corona DO. 2011. *Estudios de la Hidrólisis Biomimética por el Mecanismo Acido-Base de Sustratos Modelos del ARN*. Tesis Doctoral. UNAM.

Corona DO, Gomez P, Yatsimirsky AK. 2012. Electrophilic Assistance to the Cleavage of an RNA Model Phosphodiester via Specific and General Base-Catalyzed Mechanisms. *J. Org. Chem.* 77: 9110–9119.

Cox RA y Stewart R. 1976. The Ionization of Feeble Organic Acids in DMSO-Water Mixtures. Acidity Constants Derived by Extrapolation to the Aqueous State. *J. Am. Chem. Soc.* 98: 488.

Cox BG. 2013. *Solvent Effects on Acid-Base Strength*. 1 ed. Oxford University Press. Reino Unido.

Day CP y James OF. 1998. Steatohepatitis: a tale of two “hits”?. *Gastroenterology* 114: 842–845.

Dowling RJO, Niraula S, Stambolic V y Goodwin PJ. 2012. Metformin in cancer: translational challenges. *Journal of Molecular Endocrinology*. 48: 31–43.

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averent N, Rigolet M, Leverve X. 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275(1): 223–228.

Ekelund S, Nygren P y Larsson R. 2001. Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy: biochemical and clinical pharmacology. *Biochemical Pharmacology*. 61 (10): 1183-1193.

Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL y col. 2006. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 44: 865–73.

Farrell GC y Larter CZ. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 43: S99–S112.

Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M y Viollet B. 2014. Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*. 20(6): 953-966.

Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG y Yee D. 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 33 (7): 1674-1685.

Goodwin PJ, Stambolic V, LemieuxChen BE, Parulekar WR, Gelmon KA, Hershman DL, Hobday TJ, Ligibel JA, Mayer IA, Pritchard KI, Whelan TJ, Rastogi P, Shepherd LE. 2011. Evaluation of metformin in early breast cancer: a modification of the traditional paradigm for clinical testing of anti-cancer agents. *Breast Cancer Res Treat*. 126 (1): 215–220.

He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, Radovick S y Wondisford FE. 2009. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. 137: 635–646.

Isaacs N. 1987. *Physical Organic Chemistry*. Logman Scientific & Technical. UK.

Jin HE, Hong SS, Choi MK, Maeng HJ, Kim DD, Chung SJ y Shim CK. 2009. Reduced antidiabetic effect of metformin and downregulation of hepatic Oct1 in rats with ethynylestradiol-induced cholestasis. *Pharmaceutical Research*. 26: 549–559.

Kwan EE. 2005. Factors Affecting the relative Efficiency of General Acid Catalysis. *J. Chem. Educ*. 82(7): 1026-1030.

- Laidler KJ. 1987. Chemical Kinetics. 3rd ed. Prentice Hall.
- Jencks WP 1969. Catalysis in chemistry and enzymology. Canadá. Dover Publications. 163-198.
- Johansson A, Johansson S. 1978. Automatic titration by stepwise addition of equal volumes of titrant. *The Analyst*. 103(1225): 305-316.
- Kirby AJ, Beckmann C, Kuusela S, Tickle DC. 1998. Mechanism of catalysis by imidazole buffer of the hydrolysis and isomerization of RNA models. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*. 573-581.
- Kirby AJ y Hollefeldt F. 2009. *From Enzyme Models to Model Enzymes*. Cambridge. UK.
- Kirby AJ, Mora JR y Nome F. 2012. New light on phosphate transfer from triesters. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834: 454-463.
- Madiraju AK, Erion DM, Rahimi R, Xian-Man Zhang, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Hui-Young Lee, Cline GW, Varman TS, Kibbey RG y Shulman GI. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510: 542–546.
- Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F y Bugianesi E 2005. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology* 16 (4): 421– 427.
- McCullough AJ. 2006. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40: 17–29.
- Moreno CA, Carrillo FH, Antiñolo A y Otero A. 2014. Guanidines: from classical approaches to efficient catalytic syntheses. *Chemical Society Reviews*. 43: 3406-3425.
- Moore JK, Pearson RG, Frost AA. 1961. *Kinetics and mechanism: a study of homogeneous chemical reaction*. 3 Ed. Wiley
- Nome F, Orth ES, Brandao TAS, Milagre MS, Eberlin MN. 2008. Intramolecular acid-base catalysis of phosphate diester: modeling the ribonuclease mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 130. 2436-2437.

Owen MR, Doran E y Halestrap AP. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biochem.* 348: 607–614.

Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. 2005. Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. *Clinical Biochemistry.* 38(3): 203–217.

Sagnelli E, Stroffolini T, Mele A, Almasio P, Coppola N, Ferrigno L, Scolastico C, Onofrio M, Impalato M, Filipini P. 2005. The importance of HCV on the burden of chronic liver disease in Italy: a multicenter prevalence study of 9,997 cases. *Journal of Medical Virology* 75: 522–527.

Salvio R, Baldini L, Cacciapaglia R, Casnati A, Mandolini L, Sansone F, Ungaro R. 2013. Upper Rim Guanidino calix arenes as Artificial Phosphodiesterases. *J. Org. Chem.* 77 (7): 3381–3389.

Salvio R. 2015. The Guanidinium Unit in the catalysis of Phosphoryl Transfer Reactions: From Molecular spacers to Nanostructured Supports. *Chem. Eur. J.* 21: 1-13.

Salvio R, Volpi S, Cacciapaglia R, Casnati A, Mandolini L, Sansone F. 2015. Ribonuclease Activity of an Artificial Catalyst That Combines a Ligated Cull Ion and a Guanidinium Group at the Upper Rim of a cone-Calix arene Platform. *J. Org. Chem.* 80: 5887–5893.

Sánchez-Lombardo I, Yatsimirsky AK. 2008. Simplified speciation and improved phosphodiesterolytic activity of hydroxo complexes of trivalent lanthanides in aqueous DMSO. *Inorg. Chem.* 47: 2514-2525.

Sánchez I. 2010. Estabilización y reactividad fosfoestereolítica de hidroxocomplejos metálicos en presencia de disolventes dipolares apróticos. México, DF. Tesis de Doctorado, UNAM.

Shneider HJ y Yatsimirsky AK. 2003. Lanthanide-Catalused Hidrolysis of Phosphate Esters and Nucleic Acids in Metal Ions in biological Systems. Vol 40. A. Sigel y H. Sigel Editores. M. Dekker Inc. New York. Estados Unidos.

Suissa S y Azoulay L. 2014. Metformin and Cancer: Mounting Evidence Against an Association. *Diabetes Care.* 37: 1786–1788.

Stroffolini T, Sagnelli E, Mele A, Craxì A, Almasio P. 2004. The aetiology of chronic hepatitis in Italy: results from a multicentre national study. *Digest Liver Dis.* 36: 829–833.

Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L y Falezza G. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 54: 3541–3546.

Targher G, Bertolini L, Padovani R, Poli F, Scala L, Tessari R, Zenari L y Falezza G. 2006. Increased prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 23: 403–409.

Viollet B y Foretz M. 2011. La metformina y el cáncer a partir de la diabetes al cáncer: nuevas perspectivas terapéuticas para metformina. *Medicina Metabólica Enfermedades* 5: 29-37. Elsevier Masson SAS.

Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F y Foretz M. 2009. Activación por AMP proteína cinasa en la regulación de las funciones hepática metabolismo de la energía: de la fisiología a perspectivas terapéuticas. *Acta Physiology.* 196: 81-98.

Viollet B, Guiga B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M y Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science.* 122: 253–270.

Wolley EM, Hurkot DG y Hepler LG. 1970. Ionization Constants for Water in Aqueous Organic Mixtures. *J. Physical Chem.* 75 (22): 3908-3913.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1167–1174.