

Tesina para obtención del título de la Licenciatura en Bioquímica

Caracterización Química del Trisulfuro de Glutación y otros polisulfuros

Luis Castro

Orientador: Dr. Matías N. Möller

Laboratorio de Enzimología y Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Udelar.

2022 Montevideo, Uruguay

Índice

1.Introducción.....	4
1.1.El sulfuro de hidrógeno.....	6
1.2. Persulfuros biológicos de bajo peso molecular.....	8
1.3.Trisulfuros y polisulfuros (GSH, Cys, Ajo).....	11
1.4.Objetivos.....	22
1.4.1.Objetivo general.....	22
1.4.2. Objetivos específicos.....	22
2.Materiales y Métodos.....	23
2.1.1.Preparación de soluciones.....	23
2.1.2.Reacción para síntesis de GSSSG.....	23
2.1.3.Análisis de productos de reacción por HPLC.....	23
2.1.4.Análisis de los productos por espectrometría de masa.....	24
2.1.5. Obtención de espectros UV.....	24
2.1.6. Determinación de coeficientes de extinción molar.....	25
2.1.6.1. Titulación de TCEP con DTNB.....	25
2.1.6.2. <i>Determinación de absortividad de GSSG mediante titulación con TCEP utilizando espectrofotometría.....</i>	25
2.1.6.3. Determinación de absortividad de GSSSG mediante titulación con TCEP.....	25
2.1.6.4. Determinación de absortividad de GSSSG por estequiometría en HPLC. Reducción completa de GSSSG con exceso de TCEP.....	25
2.1.6.5. Determinación de absortividad de GS ₄ G por estequiometría en HPLC. Reducción completa de GS ₄ G con exceso de TCEP.....	26
2.1.6.6.Prospección para determinación de la [GS ₅ G] y su respectiva absortividad molar.....	26
2.1.7. Estabilidad de los polisulfuros.....	26
3.Resultados y Discusión.....	27
3.1.Síntesis de GSSSG.....	27
3.2.Análisis de productos de reacción por HPLC.....	28
3.2.1. Reacciones 1 y 2.....	28
3.2.2.Productos de reacción con derivatización.....	29
3.3.Análisis de los productos por espectrometría de masa.....	31
3.4. <i>Análisis de espectros UV.....</i>	34
3.5. <i>Determinación de coeficientes de extinción molar de polisulfuros de glutatión.....</i>	40
3.5.1.Titulación de TCEP con DTNB.....	40
3.5.2.Titulación de GSSG con TCEP.....	41
3.5.3.Titulación de GSSSG con TCEP.....	43
3.5.4. <i>Determinación del coeficiente de extinción molar del GSSSG.....</i>	45
3.5.5. GS ₄ G: análisis por HPLC.....	46
3.5.6.Estabilidad de los polisulfuros purificados.....	46
4.Conclusiones.....	49
5.Referencias.....	50
6.Anexo.....	54

Abreviaturas

$(R_{s_{n-1}}H)$	Hidropolisulfuros
$(R_{s_{n-1}}OH)$	Ácido polisulfénico
AMTS	Alil metil trisulfuro
ARNt	ARN transcripción
CAT	Cisteína aminotransferasa
CBS	Cistationina- β - sintasa
CGL	Cistationina-liasa
CYP	Citocromos P450
Cys	Cisteina
CysSSH	Persulfuro de cisteina
DADS	Disulfuro de alilo
DATS	Trisulfuro de alilo
DMTS	Trisulfuro de dimetilo
DTNB	Ditionitrobenzoico
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
GSSSG	Glutación trisulfuro
GST	Glutación S-transferasas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H_2S	Sulfuro de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAM	Iodoacetamida
mBrB	Monobromobimano
MST	Mercaptopiruvato sulfurotransferasa
NAC	N - Acetilcisteina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PLP	Piroxidal fosfato
RSOH	Ácidos sulfénicos
RSSH	Persulfuros
$RSSS_nR$	Polisulfuros
SQR	Sulfuro quinona óxido reductasa mitocondrial
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TNB	Ácido tionitrobenzoico

Resumen

Estudios recientes indican que el sulfuro de hidrógeno (H_2S) es producido enzimáticamente en la mayoría de los organismos y tiene numerosos efectos fisiológicos en humanos. La compleja química y biología del H_2S y de sus moléculas derivadas presentan enormes desafíos para el estudio de estas especies y de los mecanismos que sustentan los efectos biológicos. Los polisulfuros, ejemplos de estos trisulfuro de cisteína y trisulfuro de glutatión (GSSSG), serían depósitos claves de azufre sulfano en el organismo. Estos trisulfuros pueden reaccionar con tioles para dar persulfuros, que a su vez pueden dar H_2S . Se plantea que los efectos biológicos del H_2S estarían mediados al menos en parte por la formación de persulfuros y polisulfuros. Recientemente se caracterizó al persulfuro de glutatión (GSSH) y se encontraron propiedades interesantes y distintivas del tiol. El GSSH se obtuvo a partir de la reacción entre H_2S y GSSG, que también genera GSSSG y otros polisulfuros. En este trabajo planteamos continuar esta línea de investigación y caracterizar la molécula de GSSSG y otros polisulfuros de glutatión, en vistas de aportar herramientas útiles y eventualmente aportar mayor entendimiento a la química y los equilibrios entre estas moléculas en los sistemas biológicos. Para ello, en primer lugar se sintetizaron y aislaron por HPLC el GSSSG, GS_4G y GS_5G , y se identificaron por espectrometría de masa. Luego se determinaron los espectros de absorbancia en la región UV-vis y se utilizaron diferentes estrategias para determinar las absorptividades, con el objetivo de facilitar futuras determinaciones y cálculos estequiométricos en reacciones que involucren estas especies. Finalmente, se estudió la estabilidad en las condiciones de trabajo y almacenamiento.

1. Introducción

La compleja química y biología del H_2S y de sus moléculas derivadas presentan enormes desafíos para el estudio de estas especies y de los mecanismos que sustentan los efectos biológicos.

La clave para la versatilidad de funciones del azufre radica en la amplia variedad de estados de oxidación que puede adquirir el azufre en los sistemas biológicos que van desde -2 hasta +6 (Figura 1) (Mishanina, Libiad et al. 2015).

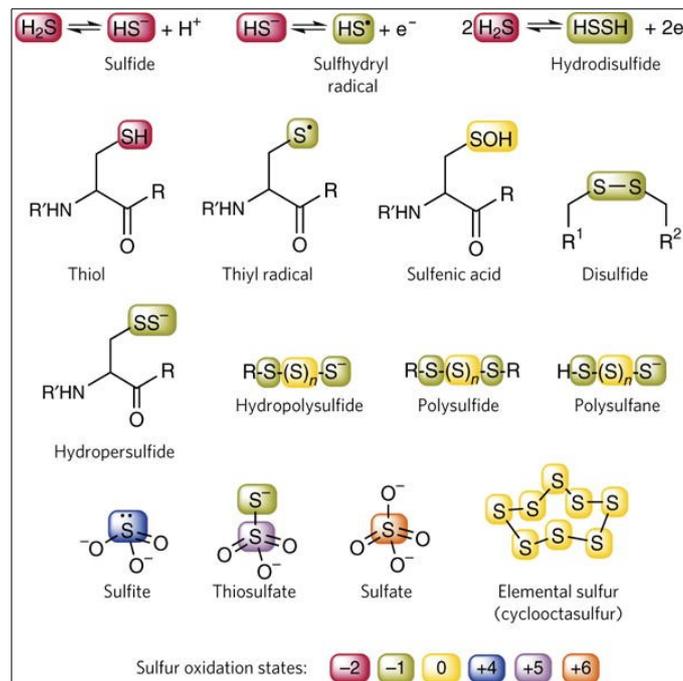


Figura 1. Especies del azufre (s) y sus respectivos estados de oxidación. En color rojo las especies con estado -2, en verde las especies con estado -1, en amarillo las especies con estado 0, e azul las especies con estado +4, en violeta las especies con estado +5 y en naranja las especies con estado +6. Figura obtenida de (Mishanina, Libiad et al. 2015)

Se plantea como posible mecanismo de señalización del H_2S su reacción con productos tiólicos de bajo peso molecular oxidados como disulfuros (RSSR) y ácidos sulfénicos (RSOH) para formar persulfuros (RSSH) (Benchoam, Semelak et al. 2020). Esta posibilidad se ve fortalecida por propiedades que tienen los persulfuros que difieren de las de los tioles de los cuales derivan, como ser mejores nucleófilos, que sus dos átomos de azufre pueden actuar como electrófilos y una mayor acidez.

Los trisulfuros y polisulfuros superiores se consideran importantes en el organismo debido a su función como reservorios de H₂S y sus rápidas reacciones para liberar persulfuros. Trabajos recientes han demostrado que los persulfuros actúan como poderosos antioxidantes y liberan H₂S, (Wu, Khodade et al. 2022)(Benchoam, Semelak et al. 2020).

Recientemente el equipo que integro en la Facultad de Ciencias de la UdelaR publicó la caracterización química del persulfuro de glutatión (GSSH) determinando el pKa y las propiedades nucleofílicas del GSSH. Dicho trabajo demostró que los persulfuros tienen una nucleofilia aumentada respecto a los tioles (RSH), una mayor acidez y uno de sus azufres puede actuar como electrófilo (Benchoam, Semelak et al. 2020).

En el trabajo mencionado, el GSSH se obtuvo a partir de la reacción entre H₂S y GSSG (Reacción 1), que también genera GSSSG (Reacción2) (Figura 2) y otros polisulfuros (Reacción 3, 4 y 5) (Bianco, Akaike et al. 2019).

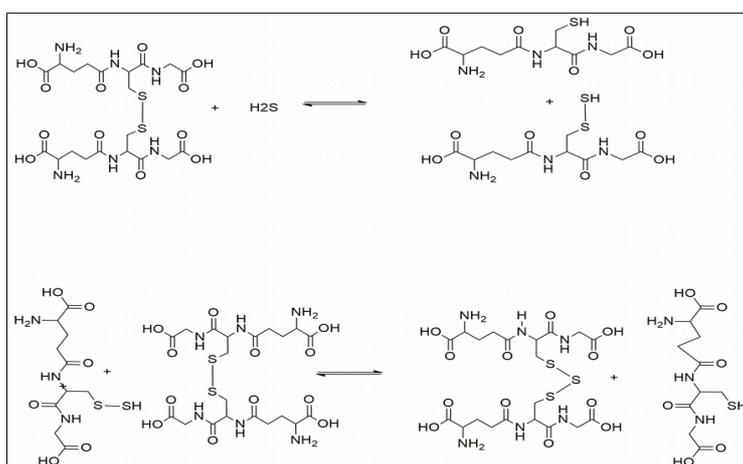


Figura 1. Reacciones de formación de GSSH y GSSSG. Se muestran las estructuras químicas de las especies de las reacciones 1 y 2. Los mecanismos de reacción se dan por medio de sustituciones nucleofílicas S_N2.



En el trabajo de Benchoam y colaboradores no se pudo caracterizar el GSSSG, pero es interesante en varios aspectos. Por un lado se plantea que se generarían cantidades equivalentes a las de GSSH, así que es cuantitativamente importante (Benchoam, Semelak et al. 2020). Además, si bien se obtuvieron estimados de la cinética de la reacción 2, sería interesante contar con valores de constantes de velocidad determinados directamente.

1.1. El sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S , sulfuro de dihidrógeno según IUPAC) es la molécula más simple de la amplia variedad de compuestos que contienen azufre. Otros derivados del azufre como los polisulfuros, ejemplos de estos trisulfuro de cisteína y trisulfuro de glutatión (GSSSG), serían dos de los depósitos claves de azufre sulfano en el organismo. El azufre sulfano tiene un estado de oxidación de cero y así se denominan los átomos de azufre que se encuentran unidos a otros átomos de azufre, o a un S de un lado y un protón del otro (Cuevasanta, Möller et al. 2017). El H_2S es un compuesto gaseoso e incoloro producido en fuentes geotérmicas, es vital para algunas formas de vidas que habitan esos ambientes y de hecho se lo ha relacionado con la evolución de los organismos vivos en la naturaleza (Olson and Straub 2016) (Benchoam, Cuevasanta et al. 2019). Durante siglos ha sido identificado y reportado como tóxico para los humanos inhibiendo la cadena respiratoria afectando la respiración celular (específicamente inhibiendo el complejo IV) (Cooper and Brown 2008). Pero va en aumento las investigaciones de las vías metabólicas que le atribuyen roles relevantes al H_2S y a sus derivados para el funcionamiento celular, generando nuevos campos de investigaciones para explorar. Como se discutirá en más detalle más adelante, el H_2S es considerado un biorregulador con una amplia gama de funciones fisiológicas (Cao, Wu et al. 2018). El H_2S es un gas estructuralmente parecido al agua H_2O pero con algunas propiedades diferentes. El azufre posee una electronegatividad menor a la del oxígeno y similar a la del hidrógeno por lo que la molécula H_2S tiene un momento dipolar menor a la del H_2O (0.97D vs 1.85D, respectivamente) (Cuevasanta, Möller et al. 2017). El azufre es más grande que el oxígeno (radios de van der Waals de 1.80 y 1.42 Å, respectivamente) tiene una electronegatividad más baja (2.58 y 3.44 en la escala de Pauling, respectivamente) y es más polarizable. Por lo tanto, el momento dipolar del H_2S es

menor que el del agua y los enlaces de hidrógeno en el H₂S no se forman a temperatura ambiente (Riahi and Rowley 2014); esto explica por qué el H₂S es un gas a temperatura y presión ambiente, con un punto de ebullición de -60 °C (Albert and Geoffrey 1988). El H₂S es soluble en agua (110 mM a 25 °C y 1 atm)(Fogg, Bligh et al. 2001)(P.G.T.Fogg,C.Young (Eds.), (IUPAC Solubility Data Series,1988,p.1). La solvatación está dominada por fuerzas de dispersión sin enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua comportándose más bien como un soluto hidrofóbico rodeado de moléculas de agua con enlaces de hidrógeno. En solución acuosa el H₂S tiene un comportamiento ácido motivo por el cual se lo suele denominar ácido sulfhídrico, con un pK_{a1} de 7.0 y un pK_{a2} > 17 a 25 °C (Millero 1986).

Estos valores determinan que en condiciones fisiológicas a pH 7.4 predomine la especie monoaniónica (HS⁻ anión hidrosulfuro) en un 71.5 %, mientras el 28.5 % restante está en la forma protonada (H₂S). La especie dianiónica (S²⁻sulfuro) se desprecia por encontrarse en concentraciones insignificantes a pHs fisiológicos. Con el objetivo de simplificar se utilizará el término “sulfuro de hidrógeno” para referirse a ambas especies en solución acuosa, cuya distribución estará determinada por el pH de trabajo.

Hace 30 años empezaron a estudiarse los efectos fisiológicos del H₂S, tras conocerse el papel que otros compuestos gaseosos desempeñaban en el metabolismo celular. El término “gasotransmisor” fue acuñado por Wang para diferenciar a estas moléculas de los mensajeros celulares clásicos. Se han listado una serie de propiedades (Scuffi, Lamattina et al. 2016) que dichas moléculas deben poseer para ser clasificadas como gasotransmisores (Jin, Wang et al. 2017, Wang, Wang et al. 2017):

- Son capaces de atravesar libremente las membranas celulares sin necesidad de hacerlo a través de un transportador específico.
- Son generados endógena y enzimáticamente, de forma regulada.
- Presentan dianas de acción específicas en las células, ya sean sus efectos mediados por mensajeros secundarios o no.
- Poseen funciones específicas y bien definidas a concentraciones fisiológicas.
- Sus funciones pueden ser mimetizadas mediante la aplicación exógena de un donador del compuesto gasotransmisor.

El H₂S es producido de manera endógena en los tejidos de los mamíferos a través de dos vías una enzimática y otra no enzimática. Por un lado la vía no enzimática es resultado de la reducción de la ruta elemental de azufre a H₂S. Esto se logra por medio de otras especies reductoras generadas a través de la oxidación de la glucosa, tales como glutatión, lactato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (Burguera, Vela-

Anero et al. 2020). Por otro lado la vía enzimática se basa en la acción principalmente de tres enzimas: cistationina γ -liasa (conocida como CSE o CGL), cistationina β -sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (MST). Esta última, actúa gracias a la acción de una cuarta, la cisteína aminotransferasa (CAT). El sustrato para la generación de H_2S endógeno es la L-cisteína (Cys), un aminoácido que contiene azufre procedente de fuentes alimentarias sintetizado a través de la vía inversa de transulfuración a partir de L-metionina y pasando por homocisteína. De esta forma, las enzimas dependientes de piridoxal fosfato (PLP), CSE y CBS catalizan la desulfuración de la L-cisteína en la producción de H_2S (Renga 2011). En la década de 1990 se comenzaron a observar efectos moduladores y de señalización del H_2S (Cuevasanta, Möller et al. 2017), asociados con una variedad de efectos fisiológicos de el H_2S en los sistemas cardiovascular, nervioso y gastrointestinal (Filipovic, Zivanovic et al. 2018). Se ha determinado que la concentración típica intracelular del H_2S está en el rango 10–80 nM en varios tejidos (Vitvitsky, Kabil et al. 2012), pero es mucho mayor en la luz del colon, con concentraciones informadas en el rango 0.2–2.4 mM (Deplancke, Finster et al. 2003).

La hidrofobicidad del H_2S permite su difusión no facilitada a través de las membranas celulares (Mathai, Missner et al. 2009, Cuevasanta, Denicola et al. 2012), aumentando potencialmente la exposición de los colonocitos a el gas. En consecuencia, las células epiteliales del colon están adaptadas para sobrevivir a la exposición aguda a niveles elevados de H_2S (Levitt, Furne et al. 1999).

Las células mantienen niveles bajos en estado estacionario de H_2S (Nicholls and Kim 1982) y la oxidan de manera eficiente a través de la vía de oxidación del sulfuro mitocondrial para generar tiosulfato y sulfato (Libiad, Yadav et al. 2014).

1.2. Persulfuros biológicos de bajo peso molecular

Los persulfuros ($RSSH/RSS^-$) participan en el metabolismo de azufre y como mediadores en los efectos de señalización del H_2S . A pesar de su creciente relevancia sus propiedades químicas son poco conocidas.

El RSSH de la Reacción (1) tiene propiedades diferentes a las de los tioles de origen. Por un lado son mejores nucleófilos (probablemente como anión RSS^-), y por otro son más ácidos. El RSSH es más ácido que el RSH correspondiente en aproximadamente 1–3 pKa unidades. Por ejemplo, el pKa del GSSH es de 5.45 ± 0.03 , 3.49 unidades por debajo del GSH (8.94) (Cuevasanta, Lange et al. 2015, Benchoam, Semelak et al. 2020). El factor que más contribuye al menor pKa de los persulfuros con respecto a los tioles es el enlace S-H más débil en el persulfuro en comparación con el tiol. Esto indica que existe un mayor porcentaje de especies aniónicas nucleofílicas RSS^- en

comparación con el tiolato (RS^-) y reacciona aún más con el RSSR electrofílico para formar RSSSR (Reacción (2)).

Es importante tener en cuenta que los niveles más altos de RSS^- (en comparación con el RSSH protonado y electrofílico) disminuirán en gran medida la velocidad inversa de la Reacción (1) ya que se requiere un RSSH electrofílico en esta reacción (Cuevasanta, Lange et al. 2015).

La alta nucleofilia de los persulfuros se puede entender en términos del llamado efecto α (Benaïchouche, Bossier et al. 1990). El efecto α se define como la mejora de la nucleofilia cuando el átomo adyacente a un nucleófilo tiene un par de electrones solitario. El efecto α se define con mayor precisión como la desviación positiva de la gráfica de Brønsted correspondiente ($\log k$ frente al nucleófilo pK_a) (Edwards and Pearson 1962).

Esto se evidencia por sus reacciones con agentes alquilantes de tioles como monobromobimano y iodoacetamida, que producen disulfuros mixtos. Esto también se evidencia por sus reacciones con disulfuros como el 5.5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) y la 4.4-ditiodipiridina para producir trisulfuros mixtos (Francoleon, Carrington et al. 2011, Cuevasanta, Lange et al. 2015). En sistemas biológicos esto hace a los RSS^- más reactivos frente a electrófilos de las células.

A pH fisiológico, el GSSH reacciona 1200, 97 y 22 veces más rápido que el GSH con los electrófilos mBrB, peroxinitrito y H_2O_2 respectivamente (Tabla 1) (Benchoam, Semelak et al. 2020). Esto puede explicarse por la mayor disponibilidad de especies ionizadas y dependiendo del electrófilo, por la mayor nucleofilia.

Tabla 1. Constantes de velocidad para las reacciones de GSH con mBrB, peroxinitrito y H_2O_2 .				
Valores extraídos de (Benchoam, Semelak et al. 2020).				
	$K_{\text{pH}}^{\text{GSSH}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_{\text{ind}}^{\text{GSSH}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_{\text{pH}}^{\text{GSSH}}/K_{\text{pH}}^{\text{GSH}\alpha}$	$K_{\text{ind}}^{\text{GSSH}}/K_{\text{ind}}^{\text{GSH}\alpha}$
mBrB	$(7.02 \pm 0.04) \times 10^3$	$(9.0 \pm 0.2) \times 10^3$	1200	4
Peroxinitrito	$(1.25 \pm 0.03) \times 10^5$	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^5$	97	1.8
H_2O_2	7.5 ± 0.6	7.7 ± 0.6	22	0.24

Recientemente se observó que los persulfuros son muy buenos antioxidantes previniendo la lipoperoxidación lipídica. El RSSH es altamente reactivo frente a los radicales peroxilo derivados de fosfolípidos (Yang, Devarie-Baez et al. 2020), esta especie se encuentra entre los mejores donantes de átomos de H reaccionando con una variedad de radicales con constantes de velocidad varios órdenes mayores que las medidas para RSH. Las reacciones radicales son más destructivas en las membranas lipídicas de la célula donde una reacción en cadena eficiente conduce a la acumulación de hidroperóxidos lipídicos produciendo la muerte celular conocida como ferroptosis,

esta es suprimida principalmente por la glutatión peroxidasa-4 (GPX4) catalizando la reducción de los hidroperóxidos de fosfolípidos. Se encontró que los derivados de RSSH eran altamente reactivos frente a los radicales peroxilo derivados de fosfolípidos, suprimiendo por completo el consumo de STY-BODIPY (una sonda fluorescente) en condiciones estándar de manera similar a la fenoxazina, el inhibidor más reactivo identificado hasta la fecha. La inhibición de la peroxidación lipídica por RSSH se caracterizó por estequiometrías de atrapamiento de radicales muy bajas (es decir, $n < 0.20$). La aparente relación de segundo orden entre n y [RSSH] es consistente con el agotamiento de RSSH por su autorreacción bimolecular, que produce polisulfuros, tioles y H_2S (Wu, Khodade et al. 2022).

Otra propiedad interesante diferente a la de los tioles es que los persulfuros muestran un carácter electrofílico que falta en los tioles originales (Cuevasanta, Möller et al. 2017). Los persulfuros protonados son electrófilos débiles. Pueden reaccionar con nucleófilos para dar tioles cuando se ataca el azufre exterior o H_2S cuando se ataca el azufre interior. El ataque sobre un azufre u otro parece estar determinado por el impedimento estérico (Kawamura, Nakabayashi et al. 1966) y por la acidez del grupo saliente, siendo el mejor grupo saliente el que tiene menor pKa.

Los persulfuros están involucrados en la biosíntesis y el catabolismo y juegan un papel en la señalización celular por esta razón es importante comprender mejor sus propiedades químicas.

La generación de persulfuros en cisteínas de proteínas constituye una modificación postraduccional que podría afectar actividades proteicas en las células (Valentine, Toohey et al. 1987) (Cuevasanta, Reyes et al. 2019).

Por ejemplo, el persulfuro de cisteína (CysSSH) puede servir como un intermediario importante en la biosíntesis de moléculas que contienen azufre como centros ferro-sulfurados, biotina y ácido lipoico, mediante la donación de su átomo de azufre sulfano (Zhang, Crack et al. 2012). Se ha propuesto que el CysSSH también está involucrado en la regulación de la metilolación del ARNt y la secreción de insulina (Takahashi, Wei et al. 2017).

Se han formulado hipótesis sobre los efectos protectores directos e indirectos de los persulfuros y se han investigando las posibles funciones antioxidantes (Bianco, Chavez et al. 2016, Millikin, Bianco et al. 2016). Estudios recientes también sugirieron que las especies reactivas de azufre pueden tener una potente actividad antiinflamatoria en células e in vivo (Zhang, Tsutsuki et al. 2021). En las bacterias, los persulfuros y los polisulfuros ofrecen protección contra las agresiones bactericidas externas causadas por las respuestas de las células inmunitarias y los antibióticos (Ono, Kitamura et al. 2021). Por lo tanto, la maquinaria productora de persulfuro específica de bacterias puede convertirse en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos antibacterianos (Khan, Fujii et al. 2018).

En el retículo endoplásmico, un ambiente con alta concentración de disulfuros, la reacción de H_2S con disulfuros podría ser más relevante que en compartimentos con escasos disulfuros como el citosol (Zhang, Macinkovic et al. 2014)

Es posible que RSSH generado biológicamente participe en muchos otros equilibrios y una descripción completa de la biología y química de los hidropersulfuros puede requerir la consideración de estos otros procesos.

1.3. Trisulfuros y polisulfuros (GSH, Cys, Ajo)

Investigaciones han confirmado la presencia en varios organismos, incluyendo bacterias y mamíferos, de hidropersulfuros (RSSH) y especies de polisulfuros de orden superior (es decir, $\text{RS}_n\text{-R}'$, $n > 2$; y $\text{RS}_n\text{-H}$, $n > 1$, con $\text{R} =$ cisteína, glutatión o proteínas) (Sawa, Ono et al. 2018).

(Ono, Kitamura et al. 2021).

Los trisulfuros están en rápido equilibrio con los tioles para producir persulfuros reactivos (RSSH) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) como se muestra en la (Figura 3).

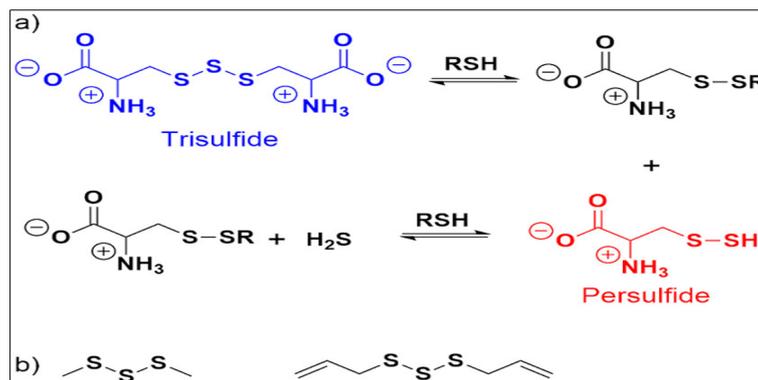


Figura 3. (a) Reacción de trisulfuro de cisteína y tioles para formar persulfuro y disulfuro. (b) Estructuras de trisulfuro de dimetilo (izquierda) y trisulfuro de dialilo (derecha). Imagen extraída de (Brown, Bowden, 2022).

En sistemas acuosos la reacción entre H_2S y RSSR da como resultado la formación de equilibrios en los que están presentes H_2S , RSH, RSSR, RSSH y RSSSR (y otras especies como polisulfuros). En un sistema biológico, cualquiera de estas especies puede ser responsable de la actividad biológica.

La generación de RSSSR no depende exclusivamente de la presencia de H_2S en un sistema biológico. Por ejemplo, RSSH se puede formar a través de la conversión de cistina (Cys-SS-Cys) al correspondiente hidropersulfuro de cisteína (Cys-SSH) y piruvato o serina a través de la cistationina γ -liasa (CSE) o la cistationina β -sintasa (CBS) (Yamanishi and Tuboi 1981). Numerosos estudios han utilizado la Reacción (1) para generar RSSH in situ (Francoleon, Carrington et al. 2011)

(Saund, Sosa et al. 2015). Se estima que a partir de la Reacción (1) se están generando otros equilibrios y otras especies paralelamente (como la Reacción (2)), esta no se ha tenido en cuenta adecuadamente en los estudios y es seguro que pueden estar presentes otras especies del azufre además de las que se muestran en la reacción de equilibrio. El RSSSR generado a partir de la Reacción (2) es más electrofílico que el RSSR correspondiente lo que indica que puede reaccionar bajo estas condiciones de reacción. En el caso de un disulfuro como RSSR, el ataque nucleofílico en cualquiera de los átomos de azufre libera RSH/RS⁻ como grupo saliente. En el caso de RSSSR, hay dos tipos de átomos de azufre un átomo de azufre sulfano y átomos de azufre no sulfano (los átomos en **negrita** de RSSSR). El ataque nucleofílico en el átomo de azufre de sulfano da como resultado un grupo saliente RS⁻ y el ataque en átomos de azufre que no son de sulfano da como resultado la expulsión de un RSS⁻ grupo saliente.

El átomo de azufre atacado es el que tiene mejor grupo saliente. Extrapolando esta idea al ataque nucleofílico en RSSSR, se esperaría que predominara el ataque en los sitios de azufre sin sulfano ya que RSS⁻ es una base significativamente más débil que RS⁻ y por lo tanto un mejor grupo saliente (Cuevasanta, Lange et al. 2015).

Aunque se pueden imaginar reacciones químicas que podrían conducir a polisulfuros de orden superior, con base en los resultados y argumentos presentados en algunos trabajos estas reacciones parecen desfavorables ya que el azufre sulfano de RSSSR tendría que ser atacado (Figuras 4 y 5) (Bianco, Akaike et al. 2019). Sin embargo, los polisulfuros de orden superior han sido observados en varios trabajos y su formación merece ser caracterizada en profundidad.

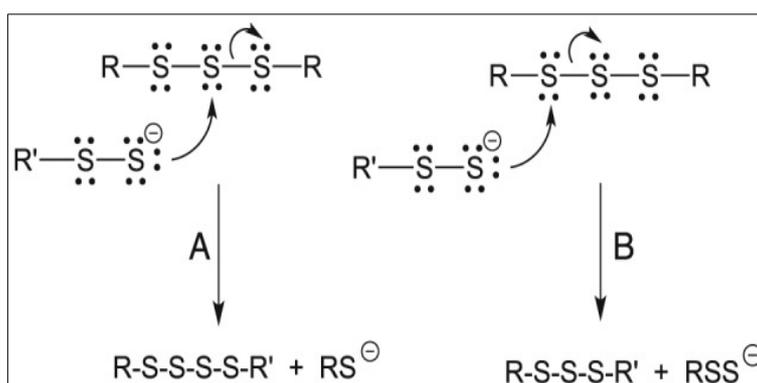


Figura 4. Reacción de un hidrosulfuro nucleofílico con un trisulfuro. (A) Ataque nucleofílico en el átomo de azufre sulfano y (B) ataque nucleofílico en un átomo de azufre no sulfano.

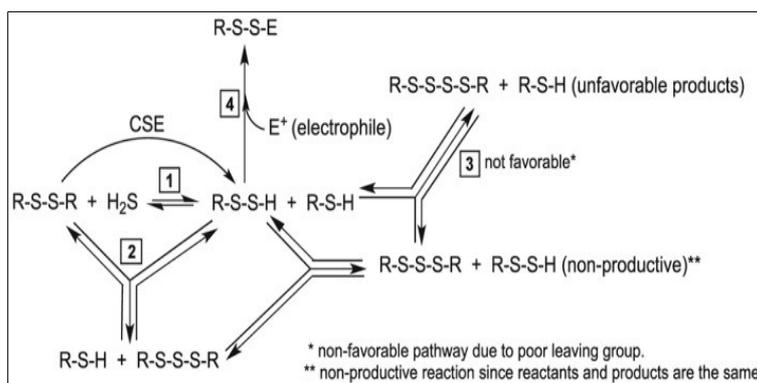


Figura 5. Otros equilibrios que podrían estar formándose con sus respectivos productos.

Imagen extraídas del artículo Bianco 2019.

Es importante tener en cuenta que se debe tener cuidado al extrapolar los resultados químicos descritos aquí a un sistema biológico. La cinética de todas las reacciones examinadas (p. ej., las reacciones directa e inversa de las Reacciones (1) y (2)) no están firmemente establecidas y es posible que las reacciones de las especies estén en equilibrio con otras moléculas biológicas.

Por ejemplo, las especies de RSSH tienen una gran actividad redox ((Bianco, Chavez et al. 2016); (Francoleon, Carrington et al. 2011)) y pueden ser interceptadas por oxidantes biológicos suaves antes de que puedan participar en las reacciones de equilibrio que se comenta en este trabajo. La conversión enzimática de especies RSSSR a través de procesos de reducción a otras especies pueden ocurrir, eliminando así los trisulfuros de las reacciones de equilibrio.

Trabajos recientes han sugerido fuertemente que los polisulfuros ($S \geq 3$) están presentes en niveles de μM en el plasma humano y que es probable que las concentraciones más altas sean incorrectas (Ikeda, Ishima et al. 2017).

Hay pocos trabajos sobre las estabildades de los trisulfuros y polisulfuros que podrían ofrecer información sobre qué valor es más preciso, algunos realizados recientemente. Según estudios con polisulfuros de glutatión ($\text{GS}_n\text{G}, n > 2$) (Akaike, Ida et al. 2017) y polisulfuros alquilados ($\text{RS}_n\text{R}, n > 2$) los enlaces azufre-azufre en los polisulfuros se vuelven susceptibles a la hidrólisis incluso en condiciones fisiológicas y alcalinas débiles en comparación con enlaces S-S en los disulfuros.

La hidrólisis de polisulfuros a pH fisiológico da como resultado la formación de tioles reducidos o hidropolisulfuros (RS_{n-1}H) y RSOH o ácido polisulfénico (RS_{n-1}OH) (Knowles and Milner 1998) (Figura 5). RSOH puede reaccionar con tioles para formar disulfuros.

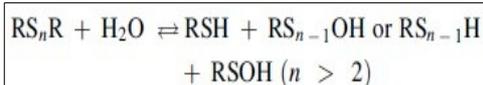


Figura 6. Reacción de hidrólisis de polisulfuros con la formación de tioles reducidos o hidropolisulfuros (RS_{n-1}H) y RSOH o ácido polisulfénico (RS_{n-1}OH).

La reacción entre RS_{n-1}OH y dichos hidropersulfuros (R'SSH) darían como resultado la formación de polisulfuros de cadena más larga ($\text{R'S}_{n+1}\text{R}$) (Figura 7). La hidrólisis de polisulfuros estaría desempeñando un papel importante en el inicio de la elongación de la cadena de azufre (concatenación de azufre).

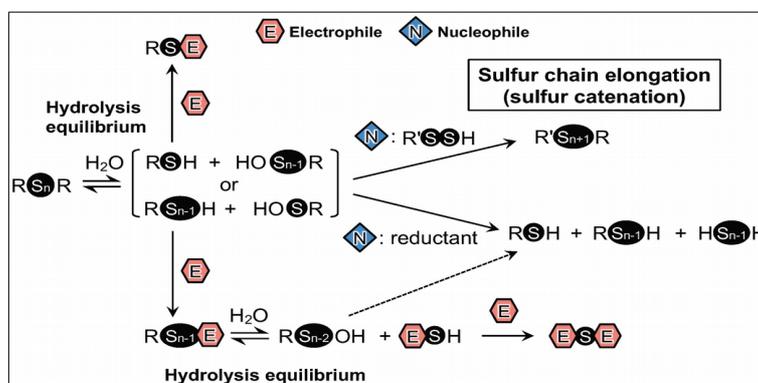


Figura 7. Equilibrio de hidrólisis de polisulfuros y su modulación por electrófilos y nucleófilos. Las especies de polisulfuro (RS_nR , $n > 2$) mantienen el equilibrio de hidrólisis con la formación concomitante de varios derivados con diferente estado redox, como tioles o sulfhidrilos (RSH), hidropolisulfuros (RS_{n-1}H) y ácido sulfénico (RSOH) o ácido polisulfénico (RS_{n-1}OH). Imagen extraída de Sawa, Ono et al. 2018.

El mismo estudio también demostró que la hidrólisis espontánea de polisulfuros en ausencia de electrófilos se suprimió notablemente mediante la adición de tirosina, un aminoácido fenólico (es decir, que contiene hidroxifenilo).

La protección dependiente de tirosina de los polisulfuros frente a la hidrólisis es un modo completamente nuevo de regulación de la homeostasis o metabolismo de polisulfuros incluso puede estar involucrado en procesos fisiológicos y puede convertirse en un objetivo específico en la modulación farmacológica de especies reactivas de azufre (Hamid, Tanaka et al. 2019)(Figura 8).

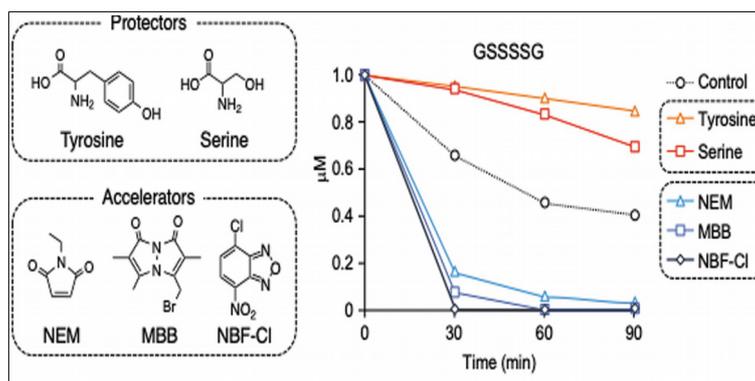


Figura 8. Hidrólisis de polisulfuro acelerada por electrófilos fuertes y protegida por compuestos que contienen grupos hidroxilo (reacción de GSSSSG (1 μM) con o sin protectores de hidrólisis que contienen grupos hidroxilo (tirosina y serina, 1 mM cada uno) o aceleradores de hidrólisis (NEM, MBB, y NBF-Cl, 1 mM cada uno) en tampón de fosfato de sodio 0.2 M (pH 8.0) a 37°C). Imagen extraída de Sawa, Ono et al. 2018.

Estudios de estabilidad con el trisulfuro del ajo dialiltrisulfuro (DATS) mostraron que después de 3 meses a temperatura ambiente y 35 °C se degradaron el 11 y el 30 % del DATS puro respectivamente, pero a 4 °C el DATS puro era estable y no se observaron cambios por HPLC (Yoo, Kim et al. 2014). En presencia de GSH, DATS se degradó rápidamente y liberó H_2S instantáneamente. GSH reaccionó con DATS en una reacción de intercambio tiol-disulfuro dejando GSH oxidado como uno de los productos de degradación junto con H_2S y otros compuestos del azufre. Cuando se disolvió el DATS en una solución micelar compuesta de propilenglicol, etanol, Tween 80 y agua se demostró que era estable a valores de pH que oscilaban entre 2.6 y 7.0 durante 15 minutos medidos por HPLC. En un estudio, se probó la estabilidad del trisulfuro de dimetilo puro (DMTS) a 4, 22 y 34 °C durante 1 año. A 4 y 22 °C, el DMTS no mostró degradación durante todo el estudio. Cuando se calentó a 34 °C el 70 % del DMTS se degradó y los productos de degradación incluyeron disulfuro de dimetilo, tetrasulfuro de dimetilo y pentasulfuro de dimetilo (Warnakula, Ebrahimpour et al. 2020).

En (Brown and Bowden 2022) se estudió la estabilidad de los trisulfuros biológicamente relevantes de cisteína, glutatión y N-acetilcisteína. Se midió la estabilidad del trisulfuro de NAC en agua tamponada a valores de pH de 5.8, 7.4 y 9.0. En cada valor de pH el trisulfuro de NAC se mantuvo estable sin degradación observable después de 8 días. Sin embargo, el trisulfuro de NAC se degradó rápidamente con butilamina y trietilamina, observándose 43 % y 14 % degradados después de 1 h, respectivamente, y 92 y 87 % después de 24 h, respectivamente (Figura 9).

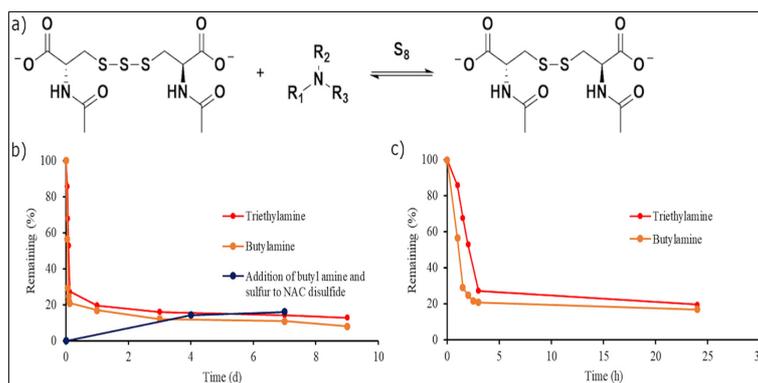


Figura 9. (a) Esquema general del equilibrio entre NAC tri- y disulfuros en presencia de una amina y azufre elemental. (b) Estabilidad del trisulfuro de NAC en presencia de butilamina (naranja) y trietilamina (rojo) medida por espectroscopía de RMN de ¹H. c) Datos de la adición de butilamina (naranja) y trietilamina (rojo) al trisulfuro de NAC para ilustrar que el equilibrio se alcanzó en menos de 5 h. Figura obtenida de (Brown and Bowden 2022).

Los productos de degradación fueron principalmente el disulfuro y un sólido blanquecino, probablemente azufre elemental. Solo se observaron cantidades muy pequeñas de tetrasulfuro (<3%) en ambas reacciones (Brown and Bowden 2022). No se observaron cambios en la estabilidad frente a Acetonitrilo y Benzamida.

Para probar la estabilidad del trisulfuro de NAC a temperaturas elevadas se almacenó en un tubo de RMN el trisulfuro en agua en un baño de aceite a 40 °C y se obtuvieron periódicamente los espectros de RMN de ¹H. No se observó degradación apreciable después de 10 días. Cuando se aumentó la temperatura a 60 °C, el 74 % del trisulfuro de NAC se degradó en 3 días con productos de degradación como el disulfuro y el azufre. La estabilidad del trisulfuro de cisteína en agua tamponada se estudió a valores de pH de 5.8, 7.0 y 9.0. A pH ácido de 5.8, el trisulfuro de cisteína se mantuvo estable con <3% de degradación durante 9 días. Cuando se añadió trisulfuro de cisteína a agua tamponada a un pH neutro de 7.0 el 40 % del trisulfuro de cisteína se degradó después de 13 días con los productos de degradación incluyendo cistina (disulfuro de cisteína) y un sólido insoluble que se identificó como azufre elemental por reacción con trifenílfosfina. En la figura 10 se muestra la estabilidad del trisulfuro de cisteína frente a aminas.

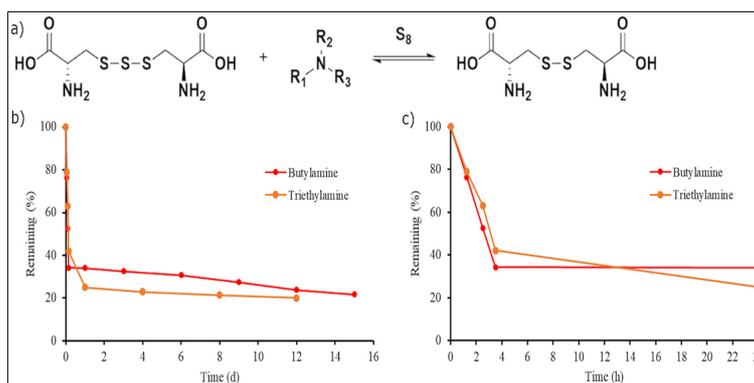


Figura 10. (a) Esquema general del equilibrio entre trisulfuro de cisteína y cistina en presencia de una amina y azufre elemental. (b) Se muestra la estabilidad del trisulfuro de cisteína en presencia de butilamina (rojo) y trietilamina (naranja) medida por espectroscopia de ¹H RMN. (c) Puntos de datos iniciales de la degradación del trisulfuro de cisteína en presencia de butilamina (rojo) y trietilamina (naranja). Figura obtenida de (Brown and Bowden 2022).

Cuando se aumentó el pH a 9.0 el trisulfuro de cisteína se degradó en un 56 % después de 13 días con los productos de degradación de cistina y azufre elemental. Esto resulta importante para comprender cómo se comportan los trisulfuros en diferentes partes del cuerpo que varían en pH, incluidas las células tumorales (pH 6.4 – 7.0), los tejidos sanos (pH 7.2 – 7.5) y el líquido pancreático (pH 8.8) (Hao, Xu et al. 2018). La degradación del GSSSG fue más rápida a valores de pH de 5.8 y 7.4 que la de los trisulfuros de NAC y cisteína. A un pH ácido de 5.8, el 71 % del GSSSG se degradó después de 10 días. A valores de pH de 7.4 y 9.0, el GSSSG se degradó un 79 y un 81 %, respectivamente. El GSSSG se degradó más rápido que el trisulfuro de cisteína debido al menor pKa del amonio en el glutatión (pKa = 9.6) en comparación con cisteína (pKa= 10.8). En presencia de butilamina y trietilamina, el GSSSG se degradó en un 29 y un 14 % después de 30 min, respectivamente, en un 78 y un 81 %, después de 1 día, respectivamente, y la degradación se estabilizó debido al equilibrio entre el disulfuro, el azufre elemental y la amina. A valores de pH de 7.4 y 9.0, el tetrasulfuro se degradó en un 55 y un 52 %, respectivamente, después de 9 días. En cada pH, el producto de degradación fue trisulfuro de NAC, azufre elemental y una pequeña cantidad de disulfuro de NAC (<3%).

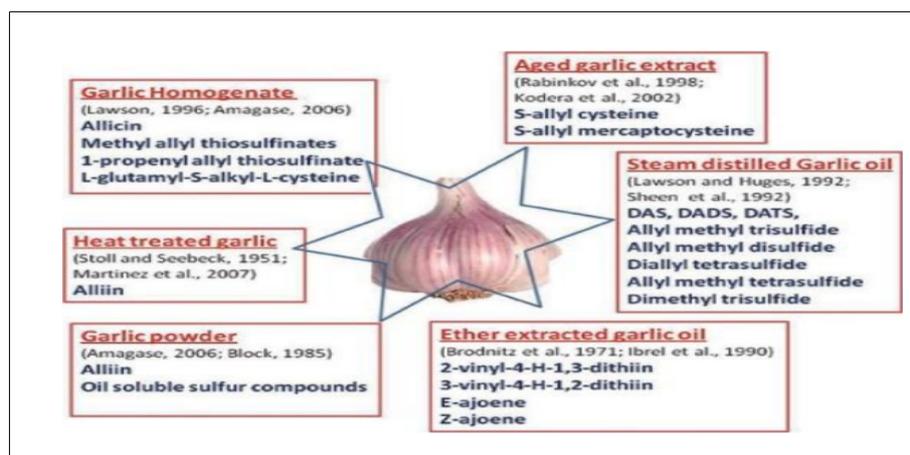


Figura 11. Compuestos orgánicos derivados del azufre y porción o extracto de la droga donde se encuentran. (Raghu R. et al., 2012).

Una importante fuente biológica de polisulfuros es el ajo (Figura 11). La especie *Allium sativum* contiene aproximadamente 33 compuestos orgánicos derivados del azufre, entre los cuales cabe destacar la aliína, alicina, ajoeno, alilpropil disulfuro, trisulfuro de dialilo (DATS), S-alilcisteína, S-alilmercaptocisteína. Además se han descrito varias enzimas, como alinasa, peroxidasa, mirosinasa y otras y 17 aminoácidos, como arginina y otros. Las propiedades biológicas y medicinales beneficiosas del *Allium sativum* se han atribuido a los compuestos orgánicos derivados del azufre (Augusti and Mathew 1974).

Los extractos acuosos y metanólicos de *Allium sativum* fueron capaces de inhibir la actividad mutagénica de la aflatoxina B1 en *Salmonella typhimurium*. El extracto acuoso de la misma especie, disminuyó también la mutagenicidad provocada por 4-nitroquinolina-1-óxido en *Escherichia coli* (Zhang et al., 1989) y la mutagenicidad de la radiación γ , H_2O_2 , hidroperóxido de cumeno, e hidroperóxido de t-butilo en *S. typhimurium*.

Se ha demostrado que los compuestos orgánicos de azufre del ajo modulan la actividad de las enzimas glutatión S-transferasas (GST), una familia de enzimas importantes en la detoxificación de carcinógenos y de los citocromos P450 (CYP), una familia de enzimas que activan muchos carcinógenos químicos en animales de experimentación. En 1986, demostraron por primera vez que el alil metil trisulfuro (AMTS por sus siglas en inglés) aumentaba la actividad de la GST en el estómago, en la mucosa del intestino delgado, en el hígado y en el pulmón de los ratones (Sparnins, Mott et al. 1986).

Los compuestos orgánicos derivados del azufre del ajo inhiben la proliferación de células tumorales, y esto se ha descrito en varios estudios donde se tratan diferentes tipos de células tumorales. En una investigación estudiaron el efecto sobre células tumorales mamarias caninas

(Sundaram and Milner 1993). Fue descrito también en líneas celulares tumorales de colon humano, de pulmón y de la piel (Sundaram and Milner 1996).

El ciclo celular también se ve afectado por el DADS, disminuye el porcentaje de células tumorales de colon humano en las fases G1 y S y simultáneamente, aumenta el porcentaje de células en la fase G2/M (Knowles and Milner 1998).

El tratamiento de las células HEK293T con Cys-SSS-Cys condujo a un aumento significativo de los hidropersulfuros intracelulares Cys-SSH y GSSH (Figura 5). Se establece que la captación de cistina en células de mamíferos se produce a través de la actividad del antiportador xc⁻, que exporta glutamato mientras capta cistina de la solución extracelular (Conrad y Sato, 2012 ; Lewerenz et al. ., 2013). Sin embargo, no se sabe si Cys-SSS-Cys también se transporta a través de xc⁻. Independientemente, Cys-SSS-Cys puede representar una posible herramienta farmacológica/de investigación para aumentar los hidropersulfuros intracelulares (aunque es necesario examinar más tipos de células para determinar si se trata de un fenómeno general). Es importante destacar que los trisulfuros (p. ej., Cys-SSS-Cys) son estables y se pueden almacenar y utilizar de manera similar a los disulfuros (p. ej., cistina). El Cys-SSS-Cys es estable en condiciones ácidas, se puede almacenar a temperatura ambiente, es estable a la descomposición durante meses y es más soluble (aproximadamente 10 veces) que cistina en solución acuosa. Por otro lado, los hidropersulfuros son intrínsecamente inestables a la desproporción y no se pueden almacenar fácilmente (Rao and Gorin 1959).

Cuando los trisulfuros reaccionan con los tioles producen persulfuros (Ida, Tomoaki, et al., (2014)) que son nucleófilos más fuertes que los tioles, lo que los hace más reactivos frente a los electrófilos en las células y mejores eliminadores de especies reactivas de oxígeno (Benchoam, Semelak, et al. 2020). Se ha demostrado que el persulfuro de cisteína (CysSSH) ayuda en la regulación de la secreción de insulina, la metilación del ARNt y la señalización de Ca²⁺ por la quinasa I dependiente de Ca²⁺/calmodulina, como potentes antioxidantes para regular los niveles de especies reactivas de oxígeno y como sustancias químicas que promueven los procesos antiinflamatorios.

Es importante tener en cuenta que los aumentos intracelulares en las especies de RSSH también pueden conducir a niveles intracelulares más altos de RSSR, RSH y H₂S a través de los procesos de equilibrio descritos anteriormente. Por lo tanto es desaconsejable concluir que la protección observada es el único resultado del aumento de los niveles de RSSH intracelular. Dado que el tratamiento de células con Cys-SSS-Cys no aumenta drásticamente los niveles de especies de RSH la protección observada claramente no se debe a RSH. Sin embargo, sigue siendo posible que la protección resulte al menos parcialmente del aumento de los niveles intracelulares de H₂S. Sobre la base de los resultados en (Bogdándi, Ida et al. 2019) y (Benchoam, Semelak, et al. 2020)

actualmente es difícil distinguir entre las acciones de RSSH de H₂S en un sistema biológico ya que son socios de equilibrio y deben estar presentes simultáneamente. Por lo tanto, los fundamentos químicos para predecir las funciones protectoras asociadas con las especies de RSSH aún no se han establecido con certezas (Ono, Kitamura et al. 2021)(p. ej., Ono et al ., 2014 ; Millikin et al ., 2016).

Algunas proteínas presentan dominios sulfurados, como es el caso del sitio activo de la SQR. La eliminación de H₂S comprende la transferencia de azufre del H₂S a un aceptor tiofilico y la transferencia de electrones del H₂S a través de FAD a la CoQ10 catalizada por medio de la SQR anclado a la membrana mitocondrial en la cadena de transferencia de electrones. La CoA actúa como un aceptor de azufre alternativo para SQR y el producto CoA-SSH forma un complejo de transferencia de carga (CT) estable con FAD en ACADS humano.

La capacidad de SQR para generar CoA-SSH tiene implicaciones importantes para regular la bioenergética del colon ya que los colonocitos utilizan preferentemente el butirato, derivado de la microbiota como biocombustible. Se ha planteado la hipótesis de que CoA-SSH podría ayudar a priorizar la oxidación del sulfuro sobre la del butirato para proteger a las células del envenenamiento respiratorio durante la exposición intestinal aguda a H₂S.

Análisis cristalográficos han brindado información estructural valiosa y llevaron a postular un mecanismo de reacción diferente. Según estos estudios, la forma activa de la SQR tiene un motivo de trisulfuro de cisteína activo redox antes y después de la catálisis (Landry, Moon et al. 2019). El mecanismo catalítico de SQR implica a un trisulfuro de cisteína como la forma activa del cofactor redox. Otra característica del mecanismo postulado, también respaldado por la estructura cristalina, es que el complejo CT se forma entre FAD y 201 Cys-SS⁻, en lugar de con el tiolato 201 Cys-S⁻. Una posible ventaja catalítica de este motivo redox es que la adición nucleófila de sulfuro a un trisulfuro es químicamente más fácil que la adición a un disulfuro, lo que explicaría en parte la mejora de la velocidad de $\sim 2 \times 10^7$ para la adición de sulfuro a SQR frente a la adición de sulfuro a un disulfuro en solución ($0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4, 25°C) (Figura 12).

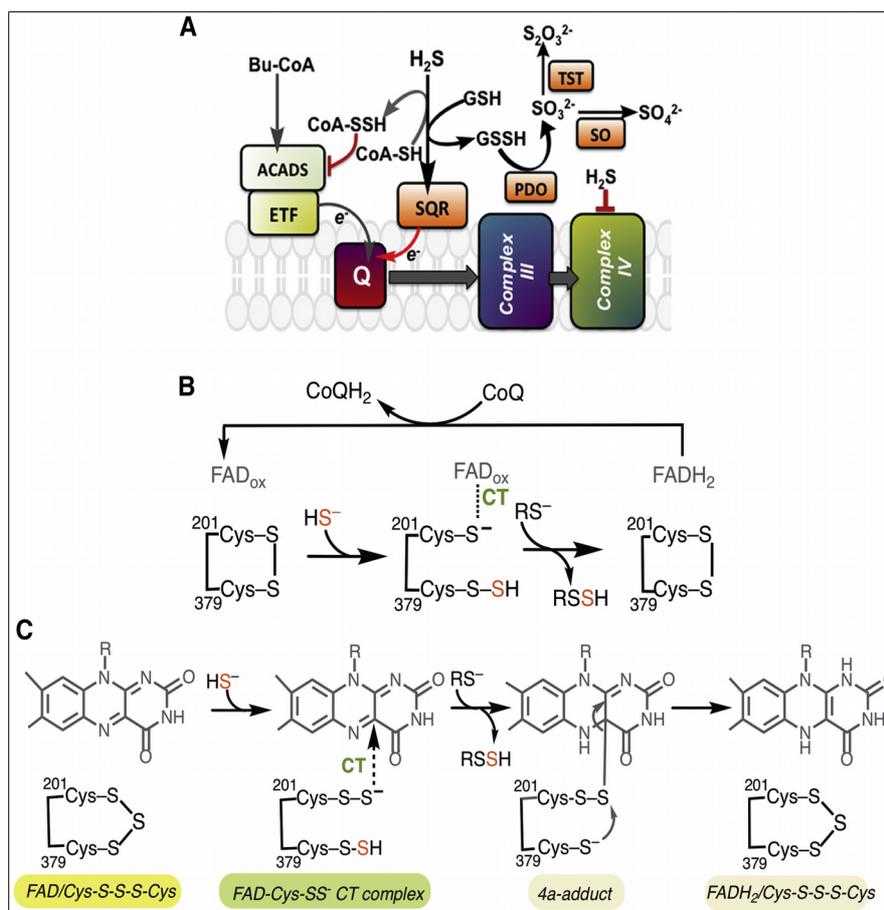


Figura 12. Intersección entre las rutas de oxidación de sulfuro y butirato y los mecanismos propuestos para la reacción SQR (a). La reacción SQR canónica utiliza GSH como aceptor para generar GSSH, con electrones dirigidos al conjunto de CoQ10. (b) El mecanismo de reacción SQR propuesto anteriormente en el que las cisteínas del sitio activo en la enzima en reposo forman un disulfuro. (c) Propuesta actual para la semirreacción oxidativa catalizada por SQR, informada por estructuras cristalinas, invoca una configuración de trisulfuro de las cisteínas del sitio activo. Figura obtenida de (Landry, Moon et al. 2019).

En este trabajo planteamos continuar esta línea de investigación y caracterizar la molécula de GSSG y otros polisulfuros de glutatión, en vistas de aportar herramientas útiles y eventualmente aportar mayor entendimiento a la química y los equilibrios entre estas moléculas en los sistemas biológicos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Purificar y caracterizar el glutatión trisulfuro y otros polisulfuros.

1.4.2. Objetivos específicos

- Purificar el glutatión trisulfuro y otros polisulfuros
- Analizar los espectros UV de los polisulfuros purificados.
- Determinar el coeficiente de extinción molar del trisulfuro de glutatión y tetrasulfuro de glutatión.

2. Materiales y Métodos

2.1.1. Preparación de soluciones

Los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EEUU), a no ser que se indique otro origen. Se realizó la preparación de buffer fosfato 0.1 M, pH = 7.4 y de buffer fosfato 0.1 M, con 0.1 mM de ácido dietiltri Aminopentaacético (dtpa, ACROS), pH = 7.4. Este último será el buffer utilizado en la mayoría de los ensayos a no ser que se indique lo contrario. Se realizó la preparación de soluciones de GSSG (AppliChem) estándar de 60 mM y GSH 20 mM, en tampón de fosfato de sodio (0.1 M, 0.1 mM dtpa, pH 7.4). Se disolvió GSH (ACROS) en el tampón mencionado a partir de estas se obtienen por dilución soluciones de 1 mM y 2 mM para observar sus espectros por espectrofotometría. El GSSG se preparó de la misma manera, para luego preparar las diluciones de 10 mM de GSSG para la reacción con H₂S.

Las soluciones stock de sulfuro se prepararon disolviendo Na₂S en agua destilada y viales sellados, inmediatamente antes de ser utilizadas, a concentraciones iniciales de aproximadamente 50 mM. A partir de ellas se realizaron las correspondientes diluciones para alcanzar la concentración deseada. Previo a ser masados, los cristales de la sal se lavaron con agua destilada y se secaron para remover impurezas de la superficie, producto de la oxidación con el oxígeno durante su almacenamiento. Para la manipulación de H₂S se utilizaron jeringas Hamilton *gas-tight* y viales sellados con volúmenes tales como para mantener la mínima fase gaseosa en todos los casos.

Se prepararon Stocks concentrados de mBrB (Sigma-Aldrich) (50 mM) en acetonitrilo calidad HPLC. Se prepararon soluciones de TCEP 0.4 M (Sigma-Aldrich) en agua destilada. A partir de esta se prepararon diluciones para los diferentes experimentos. Se prepararon soluciones de DTNB 20 mM en etanol 95 %.

Preparación de fase móvil A TFA al 0.1 % V/V en agua mQ. Fase móvil B Acetonitrilo.

2.1.2. Reacción para síntesis de GSSSG

La obtención de GSSSG se realizó a partir de la reacción H₂S + GSSG, que genera GSSH que reacciona con otro GSSG para dar GSSSG (Reacciones 1 y 2). Se prepararon soluciones de GSSG y H₂S en viales sellados a concentraciones finales de 10 mM y 5 mM, respectivamente, por dilución de los estándares. El volumen final preparado destinado para la purificación de los poslisulfuros de glutatión fue de 15 ml.

2.1.3. Análisis de productos de reacción por HPLC

- 1) En una primera instancia como medida analítica la cromatografía de fase reversa se realizó con un HPLC 1260 Infinity (Agilent) con un detector de absorbancia UV-visible de arreglo de diodos y una columna C18 Ascentis (100 × 4.6 mm, 3 μm, Sigma-Aldrich). Los

compuestos se eluyeron con un gradiente de TFA al 0.1 % v/v en agua:acetonitrilo (100:0 de 0 a 2 min, 60:40 de 8 a 10 min, 5:95 de 12 a 14 min) a un flujo de 0.8 ml/min. Los cromatogramas se registraron a varias longitudes de onda incluyendo 260 nm. Todas las muestras que se inyectan se diluyen al medio en TFA 1% para mejorar su separación en la columna. En primer lugar se inyectaron 100 µl de las especies GSSG y GSH (1 mM de cada uno) para obtención de sus cromatograma y tiempos de retención. Luego se inyectaron 25 µl de la reacción 1 y se analizaron los productos por comparación con GSH y GSSG estándar.

- 2) En segunda instancia como medida preparativa la cromatografía de fase reversa se realizó con un HPLC 1260 Infinity (Agilent) con un detector de absorbancia UV-visible de arreglo de diodos y una columna Discovery C18 Supelco semipreparativa (25 cm × 10 mm, 5 µm). En este caso se inyectaron 1 ml de la reacción 1 y se eluyeron con un gradiente de TFA al 0.1 % (v/v en agua):acetonitrilo (100:0 de 0 a 2 min, 60:40 de 8 a 10 min, 5:95 de 12 a 17 min) a un caudal de 5 ml/min. Los cromatogramas se registraron a 260 nm. Posteriormente se recogieron las distintas fracciones para identificar los productos.
- 3) En tercera instancia se realiza un análisis de productos por derivatización con mBrB. Las muestras derivatizadas con mBrB se diluyeron en TFA al 1 % (v/v) (Fluka) antes de la inyección y se eluyeron con el siguiente método (0-2') 100% A - (8-10') 60%A – 40% B – (12-16') 5% A- 95 % B (16-21') 100%A. Por un lado se inyectaron 10 µl de las especies GSH, TCEP y H₂S (0.5 mM + mBrB 4 mM + buffer de cada uno) como estándares, y luego se inyectaron 10 µl de las fracción purificadas en la parte preparatoria luego de reaccionar con TCEP 2 mM + 4 mM de mBrB + buffer en un volumen final de 200 µl. Se midieron los productos derivatizados a 396 nm.

2.1.4. Análisis de los productos por espectrometría de masa

Las fracciones purificadas por HPLC fueron analizadas por espectrometría de masas en el Institut Pasteur de Montevideo en un espectrómetro MALDI TOF en modo reflector positivo.

2.1.5. Obtención de espectros UV

Se obtuvieron los espectros UV de las diferentes fracciones directamente de los picos del cromatograma obtenido con detección del arreglo de diodos del HPLC (compuestos en 0.1% TFA con cantidades variables de acetonitrilo). Por otro lado, Las fracciones purificadas por HPLC fueron diluidas en buffer fosfato pH = 7.4 y se determinaron sus espectros utilizando por espectrofotometría empleando el rango entre 250-500 nm en el espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent, Santa Clara, EEUU).

2.1.6. Determinación de coeficientes de extinción molar

2.1.6.1. *Titulación de TCEP con DTNB*

La titulación se realizó titulando 6 muestras de TCEP de 0 – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 μM respectivamente con una solución en exceso de DTNB 2 mM. El volumen final de cada solución de reacción preparada es de 1ml en buffer fosfato pH= 7.4. A cada muestra de reacción se determinó su espectro para luego realizar la curva de calibración graficando Abs 412 nm en función de las concentraciones de TCEP utilizadas en el experimento. Se utilizó una absorptividad de $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el tionitrobenzoato (Riener, Kada et al. 2002).

2.1.6.2. *Determinación de absorptividad de GSSG mediante titulación con TCEP utilizando espectrofotometría*

Para la construcción de la curva de calibración se realizó una titulación utilizando diferentes concentraciones de TCEP (0.0 - 0.50 -1.00 -1.50 - 2.00 mM) para reaccionar en buffer fosfato pH = 7.4 con GSSG 2 mM final en un volumen final de 1000 μl todo por duplicado. Para cada reacción se realizó su espectro de absorción respectivo y se graficó los 5 juntos.

Para la determinación del coeficiente de absorptividad se graficaron los valores a 253 nm de cada reacción en función de la concentración de TCEP.

2.1.6.3. *Determinación de absorptividad de GSSSG mediante titulación con TCEP*

Para la construcción de la curva de calibración se realizó una titulación utilizando diferentes concentraciones de TCEP finales (0 - 30 - 60 - 90 - 120 μM) para reaccionar en buffer fosfato pH = 7.4 con un volumen de 50 μl GSSSG obtenido por HPLC hasta alcanzar un volumen final de 150 μl todo por duplicado. Para cada reacción se realizó su espectro de absorción respectivo y se graficó los 5 juntos. Para la determinación del coeficiente de absorptividad se graficaron los valores a 253 nm correspondiente al máximo de absorbancia del GSSSG de cada reacción en función de la concentración de TCEP y se ajustó por mínimos cuadrados. Se asumió una estequiometría 1:1.

2.1.6.4. *Determinación de absorptividad de GSSSG por estequiometría en HPLC. Reducción completa de GSSSG con exceso de TCEP*

Estándar de GSH

Se pone a reaccionar 1 mM GSH, 2 mM TCEP en buffer. Se esperan 10 min para garantizar que todo el GSH está efectivamente reducido. Se adiciona a la mezcla de 200 μl , 16 μl de mBrB 50 mM (4 mM final) y se espera 10 min para garantizar la formación completa del producto GS-B. A 50 μl de esta mezcla se le adiciona 50 μl de TFA (1%) para inyectar. Se analiza por triplicado. Se determina por HPLC el área bajo la curva del pico del cromatograma obtenido de un estándar

Determinación de [GSSSG]

Se realiza una dilución al 1/5 de la fracción purificada por HPLC correspondiente al GSSSG. Se registra su valor de absorbancia correspondiente al máximo registrado a 253 nm.

Se reduce el GSSSG que se determinó su máximo de absorbancia a GSH a partir de la siguiente reacción: 100 μ l GSSSG (fracción 10.9) + 20 μ l TCEP (20 mM) + 80 μ l de buffer. Se esperan 10 min. Se adiciona a la mezcla 16 μ l de mBrB (50 mM) se espera 10 min. A 50 μ l de la mezcla se le adiciona 50 μ l de TFA (1%) para inyectar. Se controla que el TCEP haya estado en exceso constatando la presencia de TCEP-bimano en la cromatografía. Se registran los resultados, en particular la concentración de GS-B resultante y se realizan los cálculos estequiométricos para la determinación cuantitativa de GSSSG. Con el valor de absorbancia y la concentración determinada por estequiometría por HPLC se calcula la absortividad molar del GSSSG empleando la ley Lambert- Beer.

2.1.6.5. Determinación de absortividad de GS₄G por estequiometría en HPLC. Reducción completa de GS₄G con exceso de TCEP

Estándar de GSH

Se prepara igual que descrito arriba.

Determinación de [GS₄G]

Se realiza una dilución al 1/5 de la fracción purificada por HPLC correspondiente al GS₄G. Se registra su espectro de absorbancia y el valor de absorbancia correspondiente al máximo registrado a 297 nm.

Se reduce el GS₄G que se determinó su máximo de absorbancia a GSH a partir de la siguiente reacción: 100 μ l GS₄G + 20 μ l TCEP (20 mM) + 80 μ l de buffer y se esperan 10 min. Se adiciona a la mezcla 16 μ l de mBrB (50 mM) y se espera 10 min. A 50 μ l de la mezcla se le adiciona 50 μ l de TFA (1%) para inyectar. Se registran los resultados y se realizan los cálculos estequiométricos para la determinación cuantitativa de GS₄G. Con el valor de absorbancia y la concentración determinado por estequiometría por HPLC se determinan la absortividad molar del GS₄G empleando la ley Lambert- Beer.

2.1.6.6. Prospección para determinación de la [GS₅G] y su respectiva absortividad molar

Para la determinación 100 μ l GS₅G + 20 μ l TCEP (20 mM) + 80 μ l de buffer. Se esperan 10 min. Se adiciona a la mezcla 16 μ l de mBrB (50 mM) se espera 10 min. A 50 μ l de la mezcla se le adicionan 50 μ l de TFA (1%) para inyectar.

2.1.7. Estabilidad de los polisulfuros

Se realiza una disolución al 1/5 de la muestra purificada correspondiente al GSSSG en buffer fosfato pH 7.4 y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro por un intervalo de 1 h.

Para observar la estabilidad de las muestras purificadas luego de estar congeladas a -20 °C se inyecta en el HPLC para ver sus cromatogramas a 260 nm y analizar si hubo descomposición u otra alteración en dichas muestras.

3. Resultados y Discusión

3.1. Síntesis de GSSSG

En las figuras 13 y 14 se muestran las reacciones 1 y 2 que se utilizaron para la obtención de los polisulfuros purificados. Para dichas reacciones se proponen mecanismos de sustitución nucleofílica de orden 2 (S_N2). La constante de velocidad para las reacciones 1 y 2 se estimaron en el trabajo realizado por (Benchoam, Semelak et al. 2020).

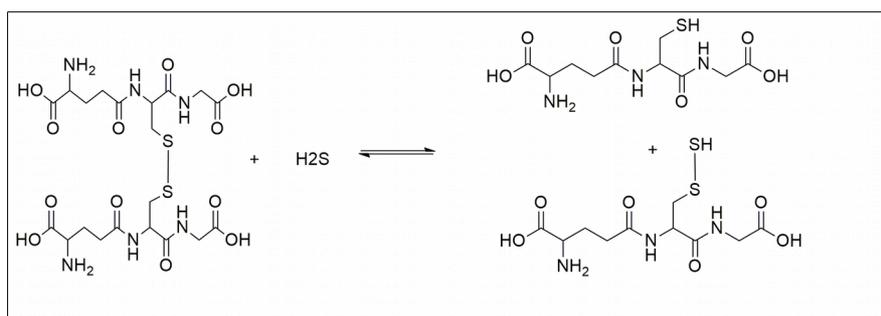


Figura 13. El mecanismo propuesto para la reacción 1 es S_N2 . Su constante de velocidad para la formación del GSH y GSSH estimada es de $0.23 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (Benchoam, Semelak et al. 2020)

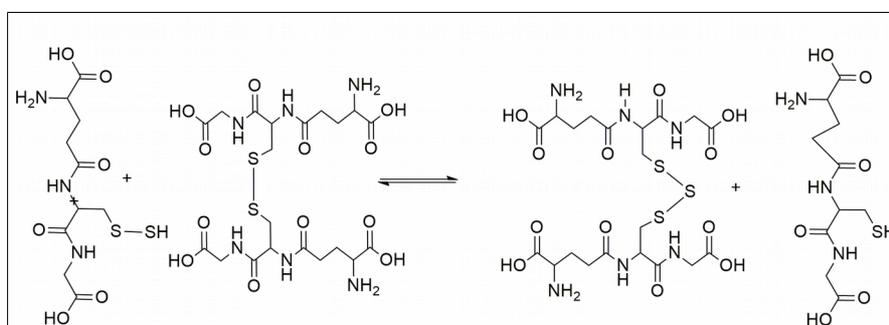


Figura 14. Para la reacción 2 el ataque nucleofílico del persulfuro al GSSG es más rápido que la reacción 1. Se estima una constante de velocidad de $2.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. (Benchoam, Semelak et al. 2020) Esto puede explicarse por aumento de la densidad electrónica en el azufre sulfano.

3.2. Análisis de productos de reacción por HPLC

3.2.1. Reacciones 1 y 2

En las figuras 15 y 16 se muestran los cromatogramas que separan los productos de la reacción entre GSSG y H₂S, obtenidos con las columnas analítica y preparativa, respectivamente. Se puede observar los tiempos de retención y los picos bien separados. En la columna analítica los tiempos de retención fueron de: 5.7 – 6.6 – 7.4 – 7.9 minutos, asignados a las especies GSSG, GSSSG, GS₄G y GS₅G, respectivamente. Los picos que siguen probablemente correspondan a las especies GS₆G, GS₇G, etc.. Para la columna preparativa, los tiempos de retención fueron: 9.6 – 10.9 – 12.6 – 13.9 minutos, asignados a GSSG, GSSSG, GS₄G y GS₅G.

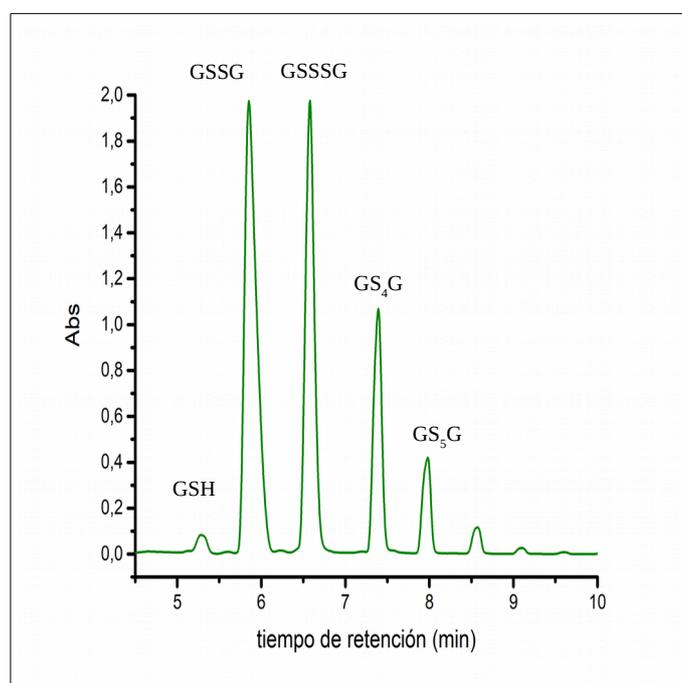


Figura 15. Cromatograma en columna analítica a 260 nm. Los tiempos de retención de cada pico fueron 5.7 – 6.6 – 7.4 – 7.9 minutos, asignados a las especies GSSG, GSSSG, GS₄G y GS₅G, respectivamente. Los cromatogramas para GSH y GSSG no se muestran.

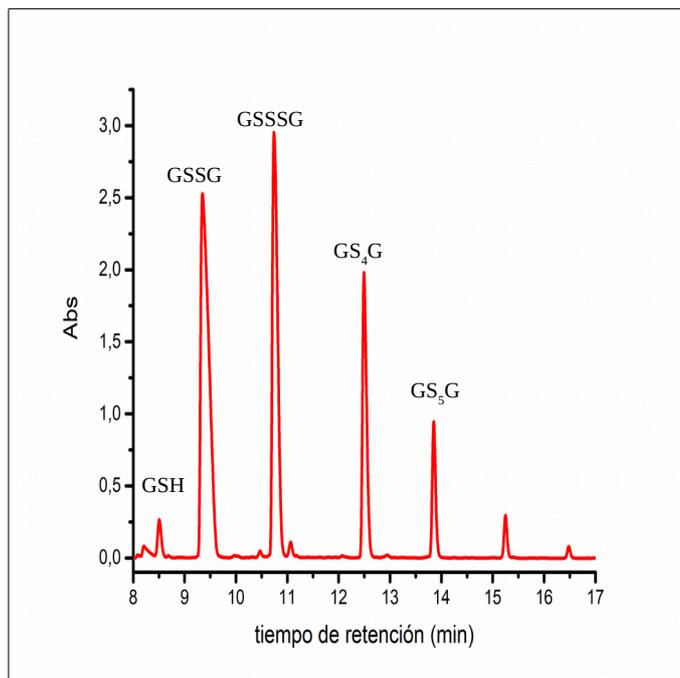


Figura 16. Cromatograma en columna semipreparativa a 260 nm. Los tiempos de retención de cada pico fueron: 9.6 – 10.9 – 12.6 – 13.9 minutos, asignados a GSSG, GS₃G, GS₄G y GS₅G. Los cromatogramas para GSH y GSSG no se muestran.

3.2.2. Productos de reacción con derivatización

Para poder identificar los polisulfuros, se planteó en primer lugar hacer una reducción con TCEP y determinar la relación H₂S:GSH. Para GSSSG se esperaba observar 1:2 de H₂S:GSH; para GS₄G 2:2, etc. Para la cuantificación de H₂S y GSH se planteó usar la reacción con mBrB, para dar lugar a los derivados con bimano del GSH, GS-B, y del H₂S, el B-S-B, que se separan en una cromatografía de fase reversa y absorben distintivamente a 396 nm. El TCEP también reacciona con el mBrB para dar TCEP-B.

En la Figura 17 se muestran los cromatogramas y los tiempos de retención a) del mBrB a los 10.86 min, en b) TCEP-B a los 9.15 min, en c) B-S-B a los 10.33 y en d) GS-B a los 7.8 min.

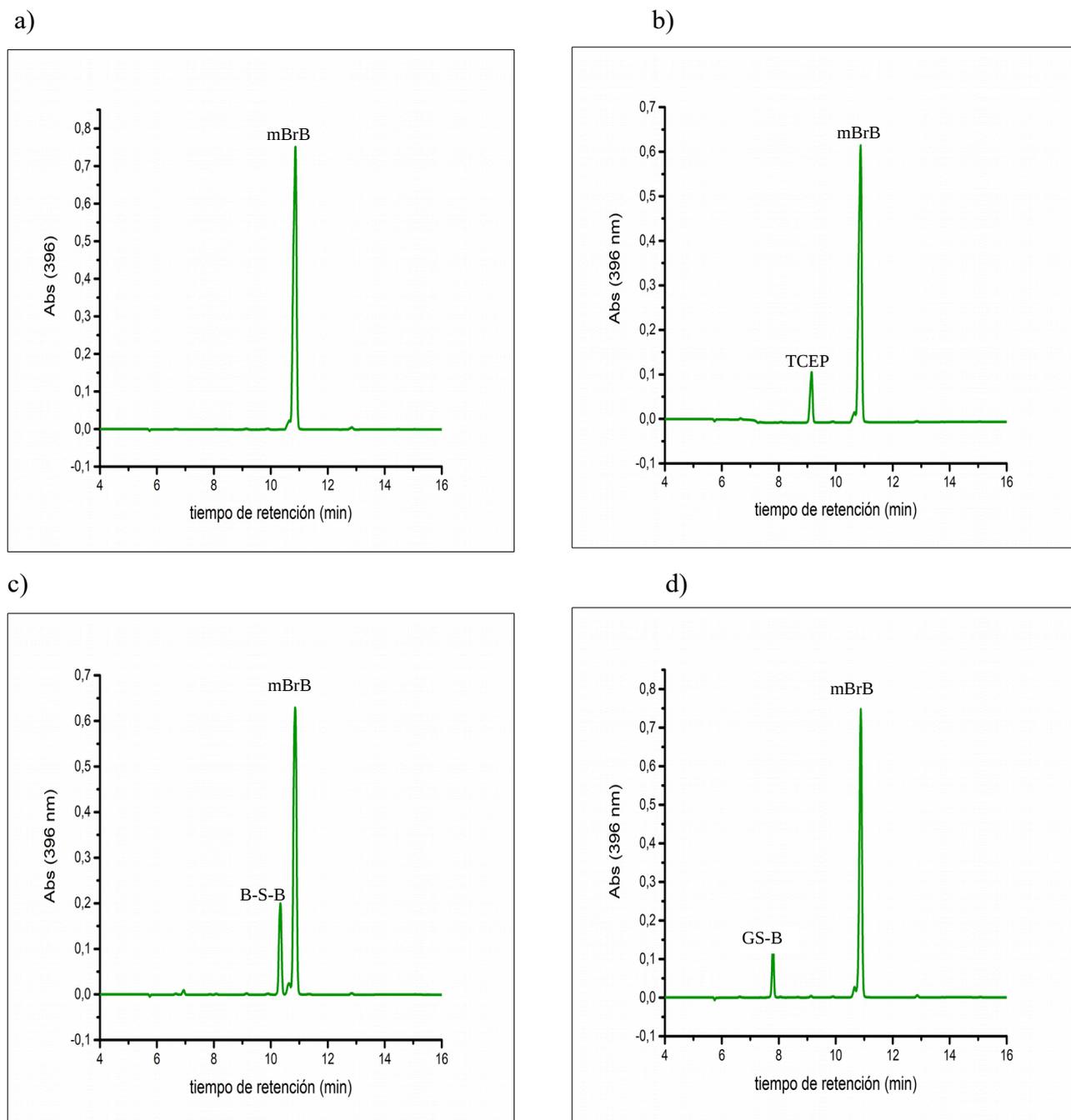


Figura 17. **a)** Se muestra el cromatograma del mBrB de 4 mM de concentración . El tiempo de retención obtenido fue de 10.86 min. **b)** Tiempo de retención para la especie TCEP-B obtenida de la reacción TCEP + mBrB. Se observa el pico de mBrB (10.86 min) dado que se encuentra en exceso y el pico del TCEP-B a los 9.15 min. **c)** Cromatograma correspondiente a B-S-B de la reacción H_2S (0.25 mM) + mBrB (4 mM). Tiempo de retención para B-S-B fue 10.33 min. **d)** Cromatograma correspondiente a la especie GS-B de la reacción de GSH + mBrB que eluye a los 7.8 min.

En la figura 18 se observa el cromatograma obtenido de la reducción del GSSSG con TCEP y su derivatización con mBrB. Se obtienen los picos correspondientes a las especies caracterizadas en la figura 17, incluyendo el mBrB, el GS-B y el TCEP-B. Sin embargo, no se observó el pico correspondiente a la reacción de $\text{H}_2\text{S} + \text{mBrB}$, el B-S-B. No sabemos a que se debe pero una posibilidad sería que el H_2S se pierda como gas del tubo de reacción. A pesar de diferentes modificaciones y esfuerzos para cuantificar el H_2S liberado, esto no fue posible, por lo que no pudimos utilizar esta estrategia para identificar los polisulfuros obtenidos anteriormente y se caracterizaron por espectrometría de masa.

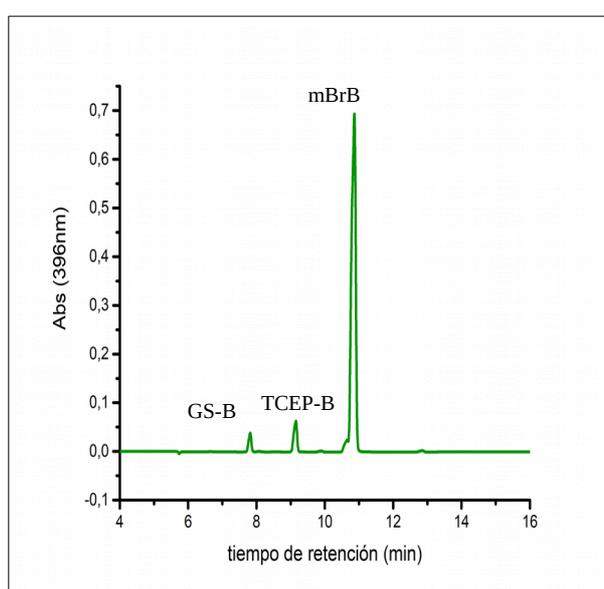
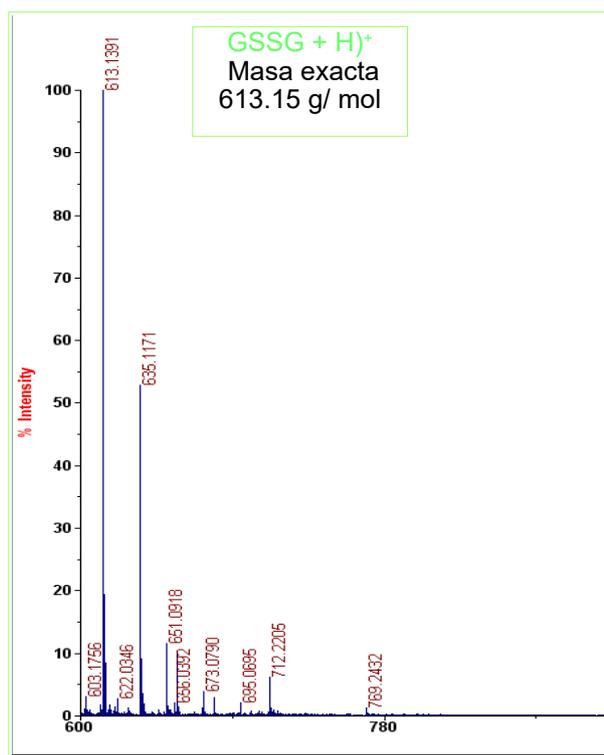


Figura 18. Cromatograma de las especies químicas obtenidas en la la reacción GSSSG + TCEP + mBrB. Se observan GS-B (7.8 min), TCEP-B (9.15 min) y mBrB (10.86 min), pero no se pudo observar B-S-B.

3.3. Análisis de los productos por espectrometría de masa

El análisis por espectrometría de masas de las fracciones purificadas como se muestra en la Figura 16 verificaron la síntesis en la reacción 1 de los polisulfuros GSSSG y GS_4G . A modo de control se analizó en primer lugar el GSSG. Se observó un ion molecular con una m/z de 613.139, coincidente con la masa exacta correspondiente al GSSG protonado es de 613.15 Da. En el espectro de masa se puede observar el aducto formado entre el GSSG + Na^+ correspondiente al segundo pico más grande ($m/z = 635.12$)(Figura 19 a y b).

a)



b)

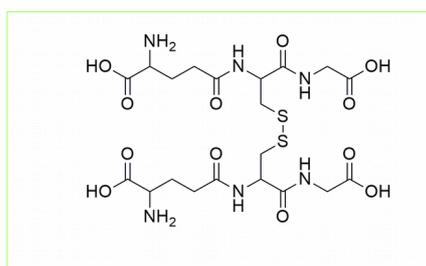
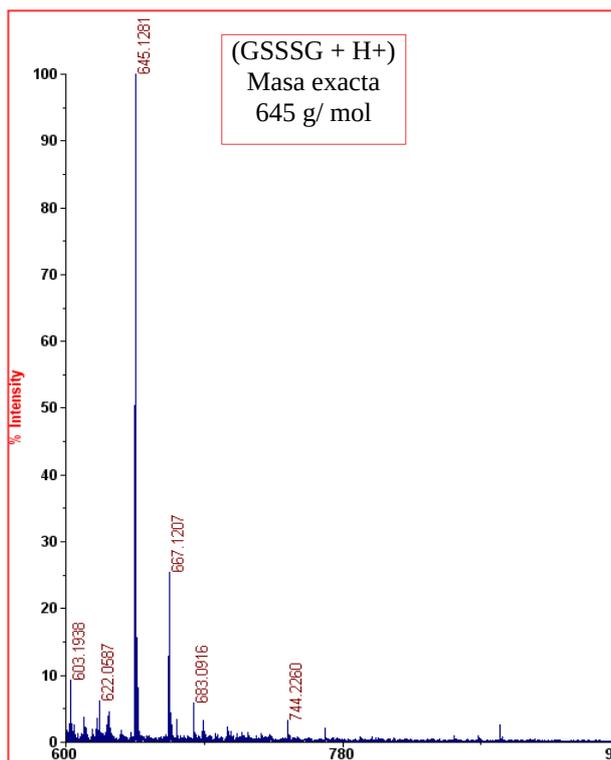


Figura19. a) Espectro de masa correspondiente al GSSG. b) Se muestra un modelo de la estructura del GSSG.

La siguiente fracción analizada fue la asignada al GSSSG. La masa correspondiente al GSSSG protonado es de 645.13 Da, que coincide con el pico más abundante en el espectro de masa. También se puede observar el aducto formado entre el GSSSG + Na⁺ correspondiente al segundo pico mas grande (m/z = 667.12)(Figura 20 a y b).

a)



b)

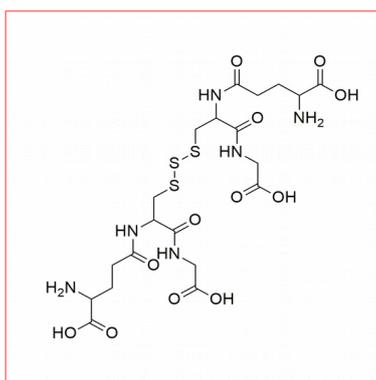


Figura 20. a) Espectro de masa correspondiente al GSSSG. El pico de mayor tamaño corresponde al ion protonado de GSSSG ($m/z = 645.13$). b) Se muestra un modelo de la estructura del GSSSG.

También se analizó la fracción purificada asignada al GS₄G. La masa correspondiente al GS₄G protonado es de 677,1 Da, que coincide con el pico principal en el espectro. En el espectro de masa también se puede observar el aducto formado entre el GS₄G + Na⁺ correspondiente al segundo pico mas grande (Figura 21 a y b).

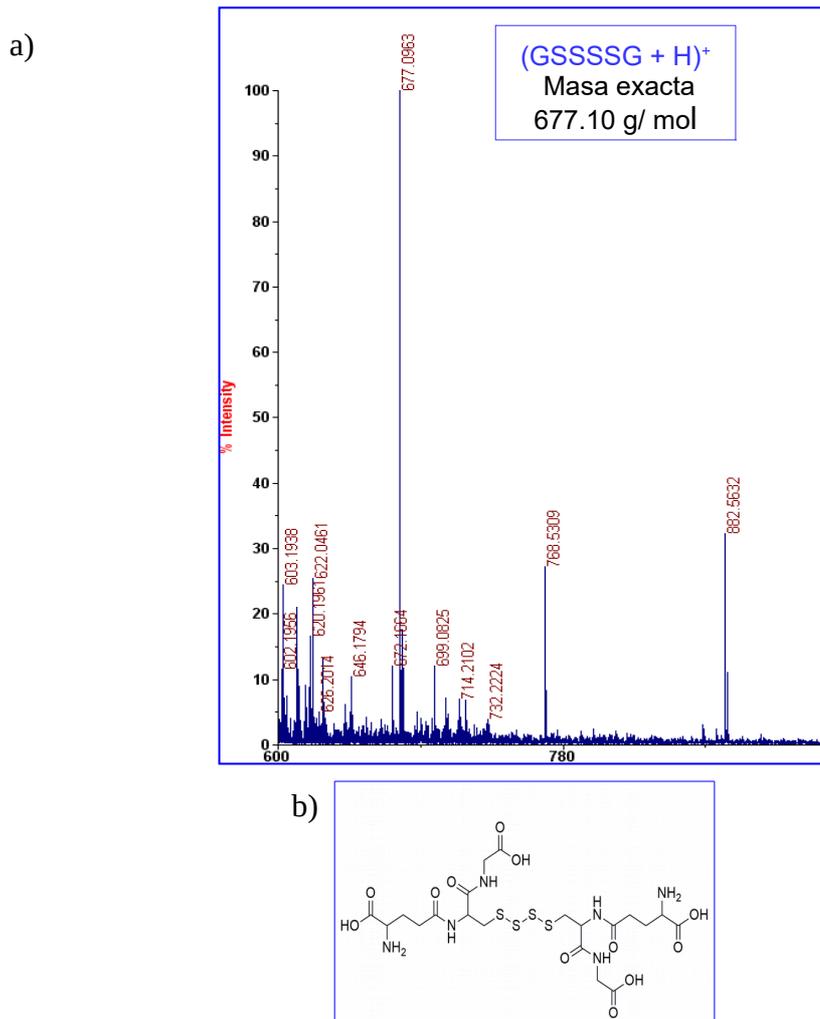


Figura 21. a) Espectro de masa de la fracción asignada al GS₄G. El pico de mayor tamaño coincide con la m/z esperada para el GS₄G protonado (677.1). b) Se muestra un modelo de la estructura del GS₄G.

3.4. Análisis de espectros UV

En la figura 22 se observa los espectros de GSH obtenidos por espectrofotometría en buffer fosfato 7.4 y por HPLC en agua con 0.1% TFA. Los espectros de GSH nos permiten confirmar que esta especie no absorbe a las longitudes de onda mayores a 255 nm a estos pHs, lo que nos permitiría diferenciarla de las especies disulfuro y polisulfuro. Es importante esta confirmación dado que para la determinación de los coeficientes de extinción molar de los polisulfuros implican reacciones en donde el GSH siempre está presente.

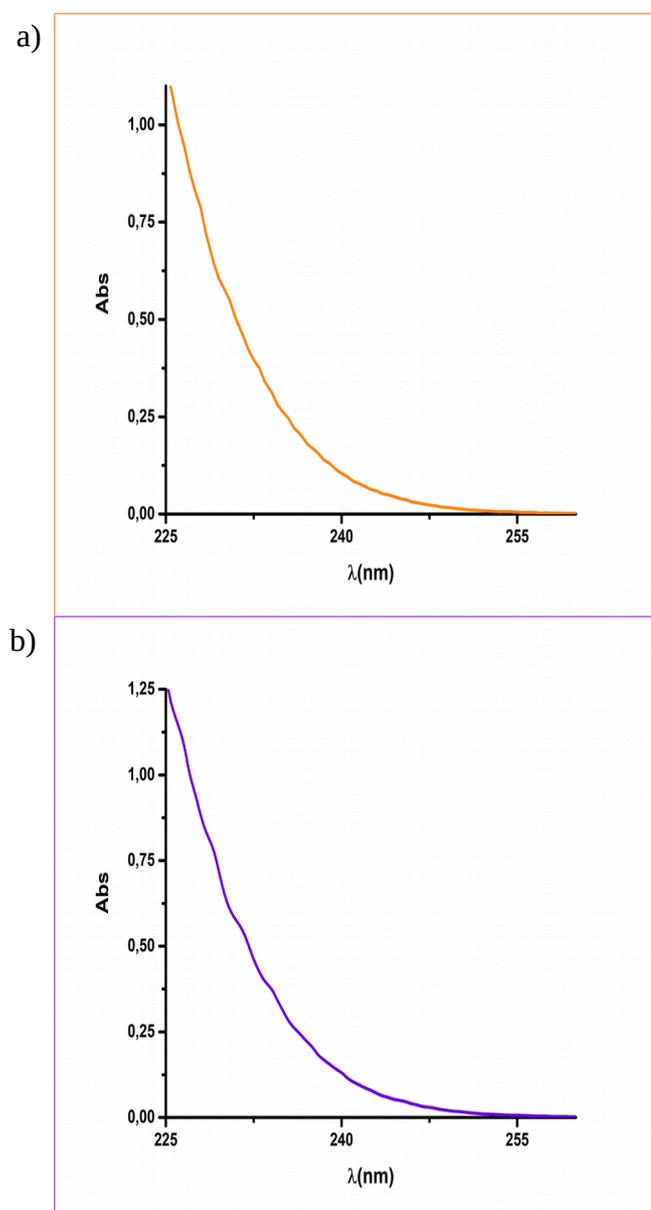


Figura 22. a) Espectro UV del GSH (1 mM) en buffer fosfato pH= 7.4 obtenido en el espectrofotómetro. b) Espectro UV del GSH en TFA 0.1% obtenido por HPLC.

En la figura 23 a, b y c se muestran los espectros UV del GSSG y su diferencial (GSSG -GSH). En primer lugar se muestra el espectro diferencial de GSSG medido en el espectrofotómetro en un rango de longitudes de onda entre 200 y 500 nm. El mismo se obtuvo restando los valores de absorbancia del GSH generados por la reducción total del GSSG con TCEP. También es importante destacar que el TCEP no absorbe significativamente a longitudes de onda mayores a 250 nm, y el producto de oxidación TCEPO absorbe aún menos ((240 nm) = $53.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $1.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, López y col, manuscrito en preparación). En la segunda imagen de la figura 23 se muestra el espectro de GSSG de la fracción purificada por HPLC. Este espectro UV es obtenido en agua con 0.1% TFA dada la fase móvil empleada para la inyección de la muestras y su posterior

elución. En ambos espectros UV se pudo determinar que el máximo de absorbancia para esta especie es de 250 nm, valor que coincide con los reportados en otros trabajos. Los espectros de la misma especie en diferentes solventes pueden variar un poco debido a que la absorción de radiación electromagnética depende de propiedades intrínseca y del entorno de la especie en estudio.

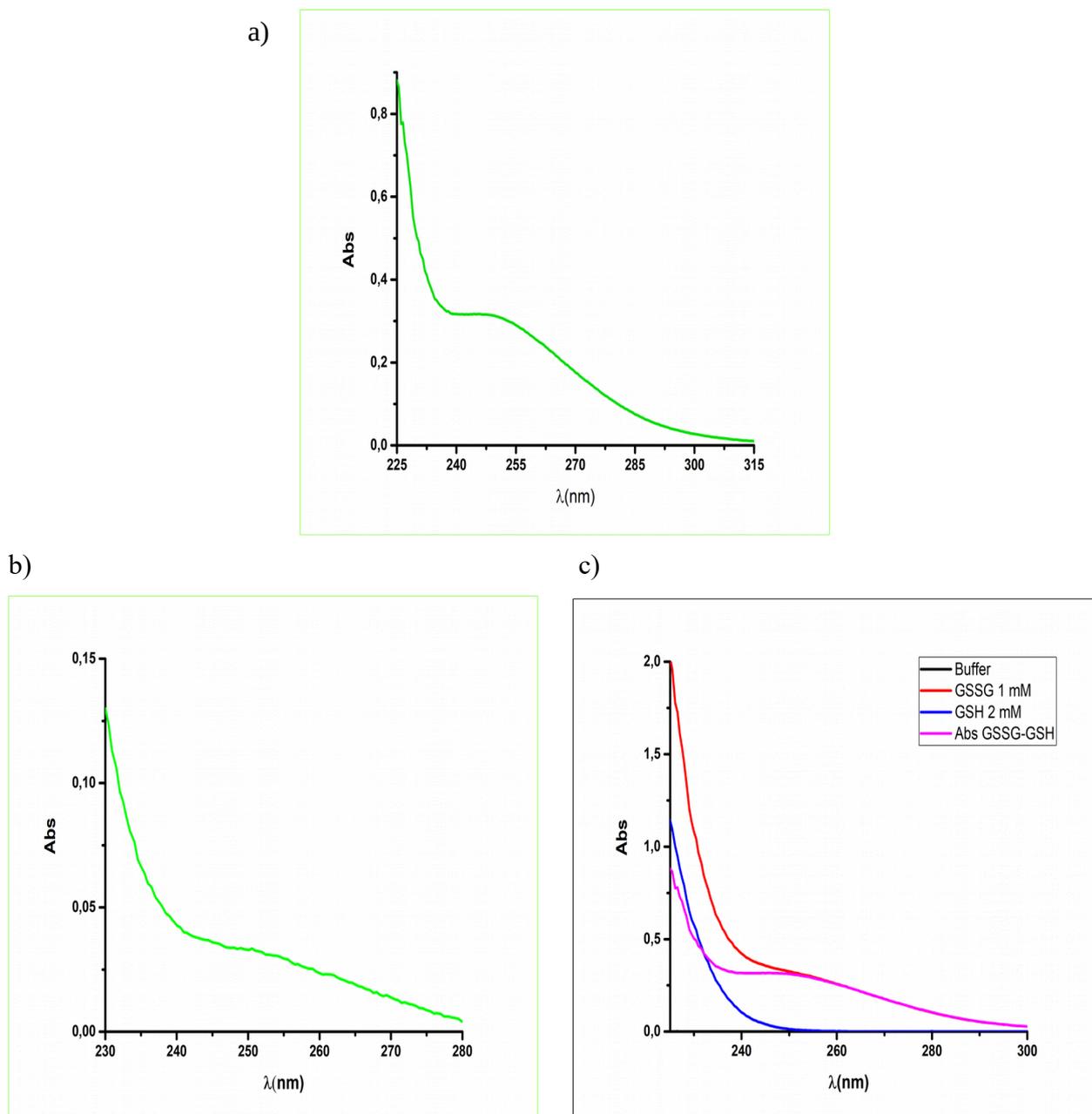


Figura 23 a). Espectro diferencial de GSSG obtenido por espectrofotometría a pH= 7.4. Se muestra el máximo de absorbancia de 250 nm. b) Espectro de absorción de GSSG de la fracción purificada obtenido por HPLC. c) Espectros de GSSG - GSH - y diferencial -.

En la figura 24 a y b se muestra los espectros UV del GSSSG purificados por HPLC. El máximo de absorbancia para esta especie sulfurada es de 253 nm, muestra un máximo muy similar al GSSG pero muestra un espectro diferente. Se puede observar claramente un espectro más ancho lo que demuestra que esta especie absorbe más en longitudes de onda mayores. Para un mejor entendimiento del por qué de este aumento en la absorción se debería realizar un análisis cuántico empleando herramientas informáticas.

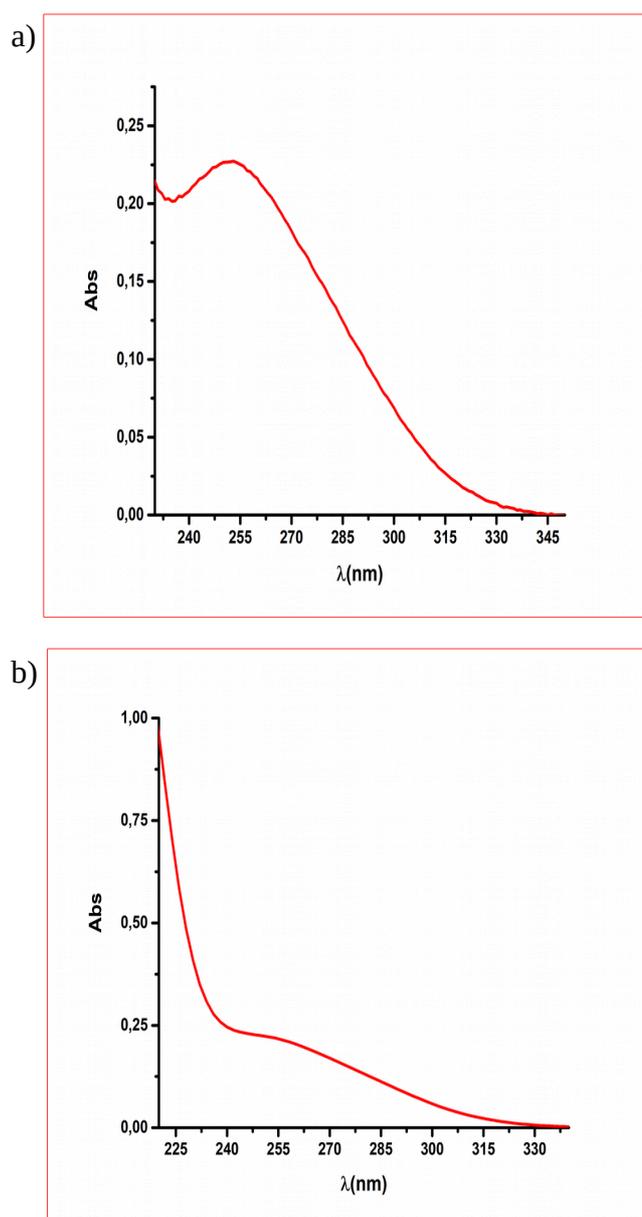


Figura 24 a) Espectro UV diferencial de GSSSG a pH= 7.4 obtenido por espectrofotometría. Se restó el espectro de GSSSG obtenido a una solución de 1 mM GSH. Se observó un pico de absorción a 253 nm. **b)** Espectro UV de GSSSG obtenido por HPLC (en agua con 0.1% TFA).

En la figura 25 y 26 se muestran los espectros UV de las especies GS₄G y GS₅G purificadas por HPLC. Para estas especies polisulfuradas se puede observar un corrimiento de los máximos de absorción con respecto a las especies GSSG y GSSSG.

Para el GS₄G el máximo de absorbancia es de 294 nm y para el GS₅G es de 300 nm. En la imagen se muestra los espectros obtenidos en buffer fosfato pH= 7.4 en el espectrofotómetro y en medio ácido TFA por HPLC.

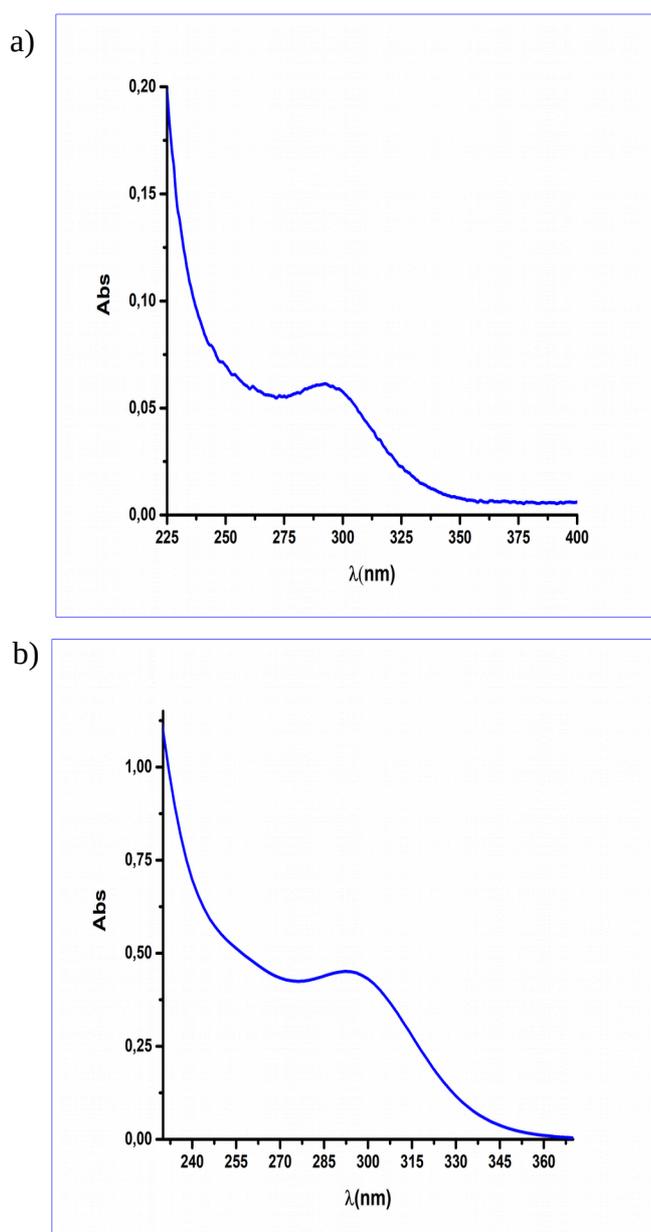


Figura 25 a). Espectro UV de GS₄G en buffer fosfato pH= 7.4. Se registra un máximo de absorbancia a 294 nm. b) Espectro UV de GS₄G obtenido en HPLC (agua con 0.1 % TFA). Se registra un máximo de absorbancia a 294 nm.

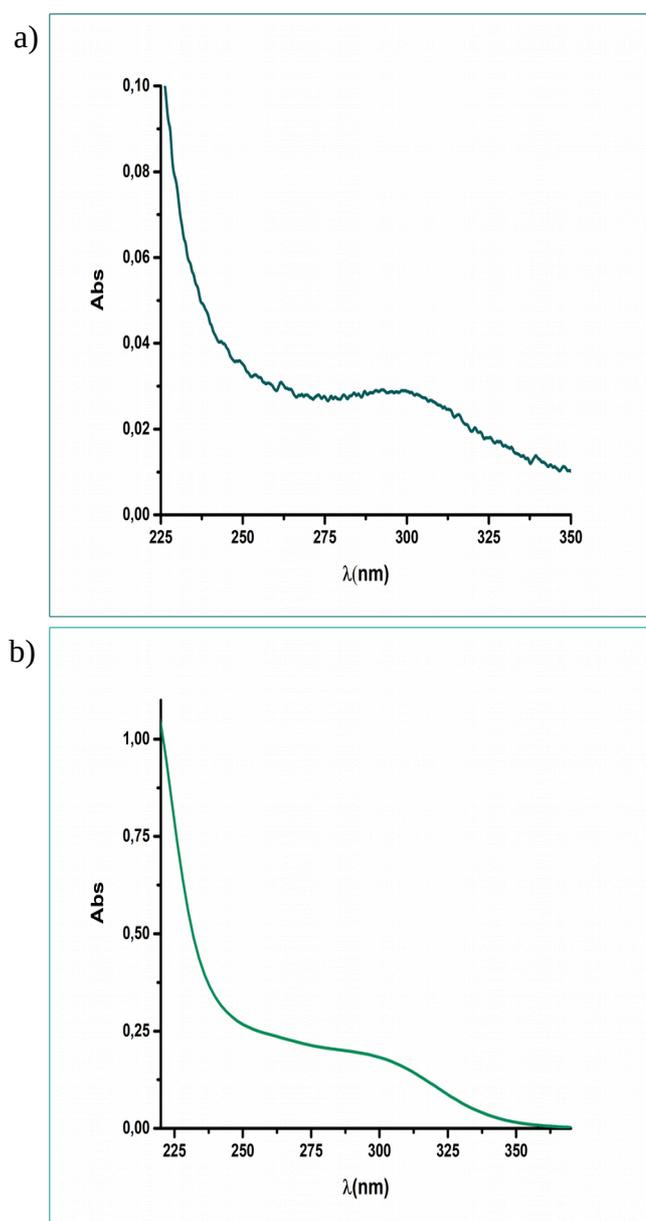


Figura 26. a) Espectro UV de GS₅G purificado, obtenido por espectrofotometría a pH= 7.4. Se registra un máximo de absorbancia a 300 nm.

b) Espectro UV de GS₅G realizado en HPLC (agua con 0.1% TFA).

3.5. Determinación de coeficientes de extinción molar de polisulfuros de glutación

3.5.1. Titulación de TCEP con DTNB

Se valoraron [TCEP] crecientes de 0, 10, 20, 30, 40, 50 μM con el agente titulante DTNB 2 mM según la reacción que se muestra en la figura 27, en diferentes ocasiones. Se determinó que la [TCEP] inicial siempre presentó el mismo valor de 2 mM, lo que indica que el TCEP es estable siempre que se mantenga en frío.

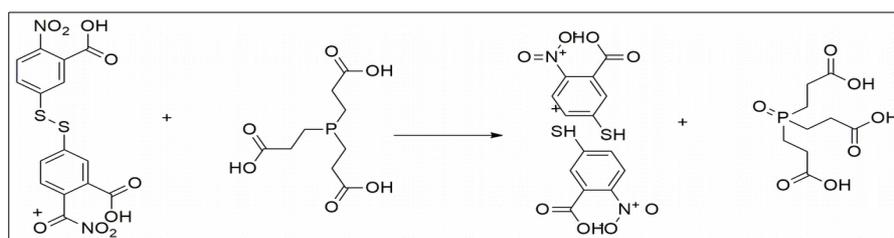


Figura 27. Ecuación química que representa la reacción entre TCEP + DTNB dando como producto TNB + TCEPO.

En la figura 28 se muestra el espectro de TNB para cada concentración de TCEP valorado. Las medidas de absorbancia se realizaron a 412 nm que es el máximo que absorbe la especie TNB.

La figura 29 muestra la curva de calibración obtenida de las medidas de absorbancia a 412 nm vs [TCEP]. El valor de la pendiente resultó de 0.028.

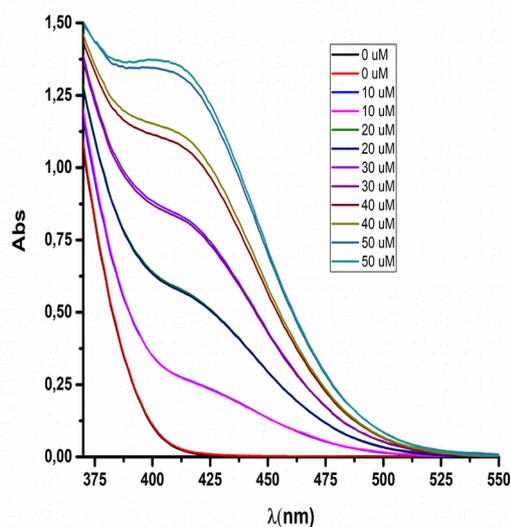


Figura 28. Espectro de absorción de TNB para cada reacción frente [TCEP] crecientes de 0, 10, 20, 30, 40, 50 μM .

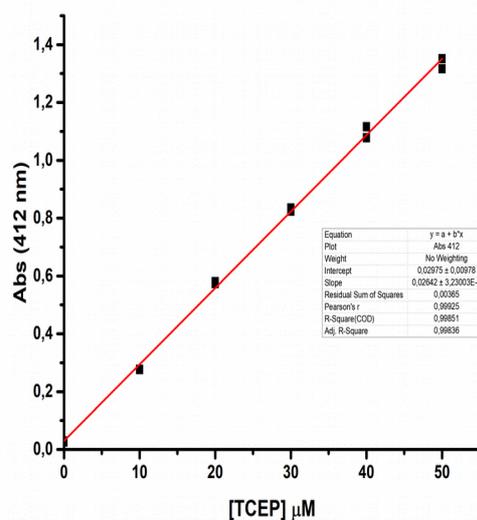


Figura 29. Curva de calibración de TCEP 0, 10, 20, 30, 40, 50 μM con el agente titulante DTNB 2 Mm.

$$\Delta\text{Abs}/\Delta[\text{TCEP}] = \text{Pendiente} / 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 0.028 / 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times \text{factor de dilución} = 1.98 \text{ mM de TCEP.}$$

3.5.2. Titulación de GSSG con TCEP

Para la obtención del coeficiente de extinción molar del GSSG se valoró frente a concentraciones crecientes de TCEP previamente valorado según la siguiente reacción química. La reducción del GSSG se realizó utilizando el TCEP, un agente reductor muy empleado en la química de tioles y del azufre. Esta reacción da como productos de generación de TCEPO (forma oxidada del TCEP) y GSH (Figura 30).

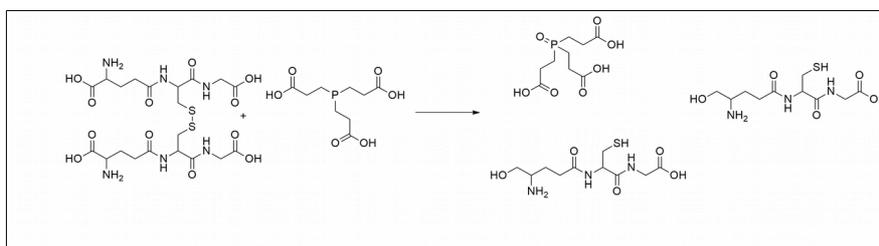


Figura 30. Reacción entre el GSSG y TCEP. Los productos de dicha reacción son el GSH y TCEPO.

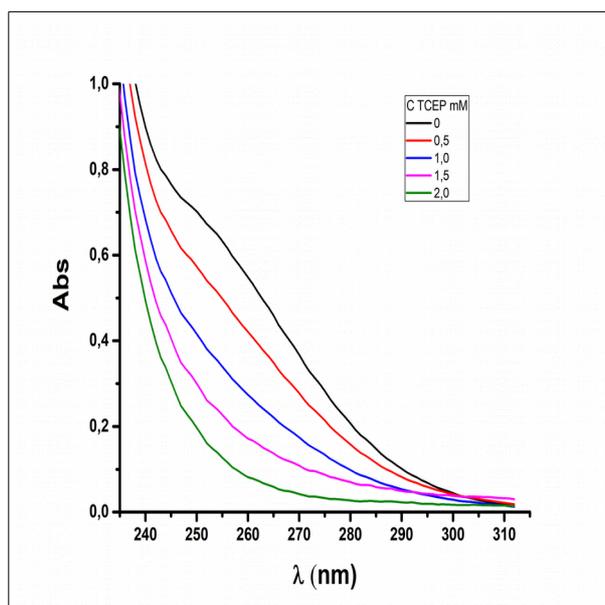


Figura 31. Espectro de absorción de GSSG vs [TCEP] crecientes.

En la figura 31 podemos observar el espectro de absorción de GSSG obtenido para cada reacción frente a las concentraciones crecientes de TCEP. Las absorbancias fueron obtenidos por espectrofotometría midiendo en un rango ente 200 y 500 nm. Para la realización del espectro se muestra el rango donde las especie GSSG muestra mayor absorción.

En la figura 32 se muestra la curva de calibración obtenida midiendo la absorbancia a 253 nm de GSSG (que se va consumiendo) vs las [TCEP] crecientes empleadas para la valoración. La pendiente de la curva de calibración corresponde al $\epsilon^{253}_{\text{GSSG}}$ x el factor de dilución (1000). Se determinó el coeficiente absortividad para GSSG dando un valor de $\epsilon^{253}_{\text{GSSG}} = 275 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El valor reportado para esta especie es de $270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (Johnson and Beer 1971). No hay mucha bibliografía que muestre como se determinó ni muchos reportes de dicho valor. Nuestros resultados arrojaron un valor muy cercano al reportado y presentan un método experimental para determinarlo.

Es importante contar con una constante física como el coeficiente de extinción molar del GSSG dado que es una especie que esta en varios equilibrios químicos biológicos. Recordemos que el GSSG es una especie que permite medir el estrés oxidativo de una célula comparando con las concentraciones de GSH. Además como demostramos en este trabajo es blanco de otras reacciones dado que esta reaccionando con persulfuros y formando otras especies polisulfuradas.

En síntesis se obtuvo un coeficiente de extinción molar para GSSG y reportamos un método para su determinación experimental. A continuación intentamos utilizar este método para determinar el coeficiente de extinción molar del GSSG.

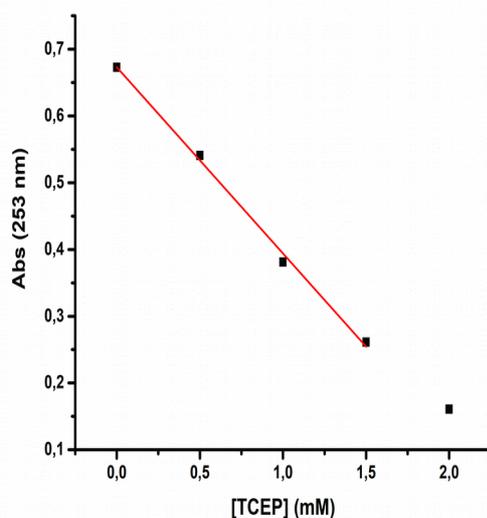


Figura 32. Curva de calibración obtenida a partir de las Abs₂₅₃ vs [TCEP]. La pendiente de la curva de calibración corresponde al $\epsilon^{253}_{\text{GSSG}}$ x el factor de conversión (1000). Se determinó el coeficiente absorptividad para GSSG dando un valor de $275 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.3. Titulación de GSSG con TCEP

La valoración de GSSG se realizó con TCEP. La reacción se muestra en la figura 33. Esta reacción da como producto 2 mol de GSH más 1 mol de H_2S .

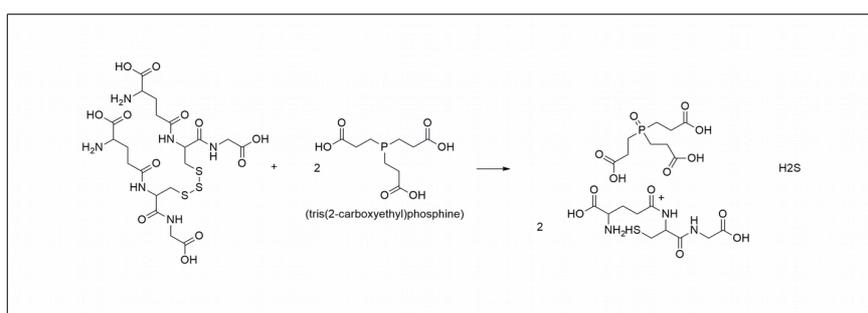


Figura 33. Ecuación química que representa la reducción del GSSG generando GSH + H_2S .

En la figura 34 y 35 se muestra el espectro obtenido para las diferentes reacciones entre GSSG y TCEP y la curva de calibración entre las Abs 253 y las concentraciones de crecientes de TCEP. Se puede observar que a medida que aumentaba las concentraciones de TCEP descende las absorbancias de la especie GSSG debido a su reducción parcial a GSH. El GSH no absorbe a estas longitudes de onda. De la curva de calibración se obtuvo una estimación de coeficiente de extinción molar del GSSG. El valor estimado es de $1050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Este procedimiento experimental tiene la desventaja La reacción en la valoración es un poco más compleja dado que en la figura se muestra los productos que se obtiene cuando usamos un exceso de TCEP.

Con esto queremos aclarar que mientras se esta titulando GSSSG con TCEP en defecto se están formando otras especie como GSSG, GSSH y los productos de la reducción total como GSH y H_2S . La presencia de reacciones paralelas a la que muestra la figura implica que el valor obtenido del coeficiente de extinción molar está subestimado, dado que las otras especies estarían contribuyendo en la absorbancia. Posiblemente la pendiente de la curva en la ausencia de estas especies intermedias sería mayor lo que el coeficiente de extinción molar para GSSSG sería en realidad mayor al estimado en este experimento.

Este inconveniente no ocurre en la valoración anterior realizada al GSSG, porque su reducción con TCEP siempre forma GSH y no especies intermedias que dificultan la determinación de ϵ_{GSSG} . Dado este inconveniente, tuvimos que rediseñar la estrategia para determinar el coeficiente de extinción molar del GSSSG.

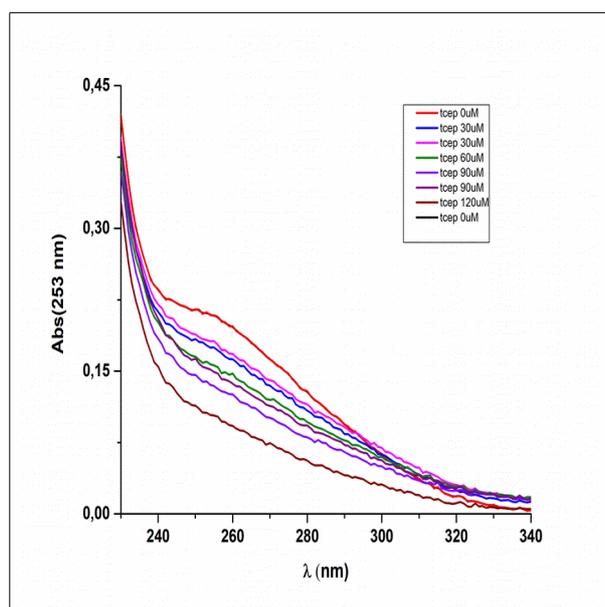


Figura 34. Espectro de absorción para la valoración de la especie GSSSG.

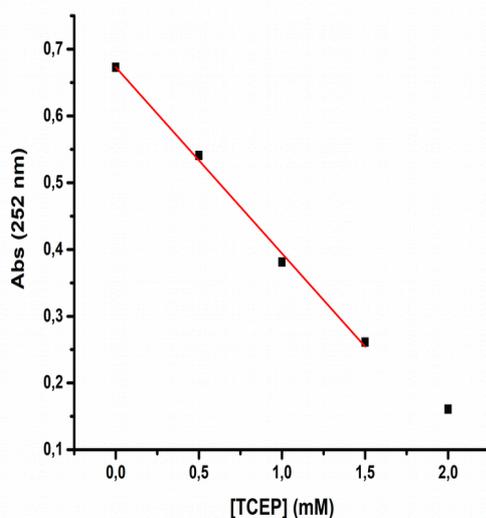


Figura 35. Curva de valoración del GSSSG con TCEP. Estimamos el coeficiente absorptividad para GSSSG dando un valor de $1050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.4. Determinación del coeficiente de extinción molar del GSSSG

Para determinar el coeficiente de extinción molar del GSSSG se optó por una aproximación combinando los espectros de absorción de la solución de GSSSG de partida, con la concentración de GSH hallada por ensayo de reducción con exceso de TCEP, derivatización con mBrB y cuantificación de GS-B por HPLC. La estequiometría es 2 GS-B por GSSSG. La diferencia con la aproximación usada al inicio para identificar los polisulfuros es que aquí no se pretende cuantificar el H_2S liberado.

Los cálculos correspondientes se muestran en el anexo I. El promedio de la absorptividad a 253 nm es de $1358 \pm 11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el GSSSG ($N = 3$).

Es interesante observar como el máximo del espectro de absorción no cambia demasiado respecto al GSSG, pero la absorptividad es casi cinco veces mayor. Para un máximo de absorción particular, la magnitud de ϵ depende de la sección transversal de captura de las especies y de la probabilidad de que tenga lugar una transición que absorba energía. Se ha demostrado que la relación entre ϵ y estas variables es $\epsilon = 8.7 \times 10^{19} \text{ PA}$. Donde P es la probabilidad de la transición y A el área blanco de la sección transversal en centímetros cuadrados por molécula. Por lo general la absorción de radiación ultravioleta o visible es resultado de la excitación de los electrones de enlace. Consideramos que un aumento en el tamaño de la molécula estaría ocasionando un aumento del área transversal y el aumento de número de electrones implicados un aumento de las probabilidades de la transición, explicando la mayor absorptividad.

3.5.5. GS₄G: análisis por HPLC

Para determinar el coeficiente de extinción molar del GS₄G también se usó la aproximación explicada anteriormente combinando los espectros de absorción de la solución de GS₄G de partida, con la concentración de GSH hallada por ensayo de reducción con exceso de TCEP, derivatización con mBrB y cuantificación de GS-B por HPLC. La estequiometría es 2 GS-B por GS₄G.

Los cálculos correspondientes se muestran en el anexo II. El promedio para la absorptividad a 294 nm del GS₄G fue de $1598 \pm 7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En este caso, tanto el máximo de absorbancia como la absorptividad fueron mayor que para el GSSSG. La explicación del aumento de la absorptividad sería la misma que planteada anteriormente, pero de alguna manera se esperaba un aumento mayor de la absorptividad. Tal vez esto se compensó por la menor energía necesaria para la transición (máximo de absorbancia de 294 nm vs 253 nm). Sería muy interesante realizar cálculos de química cuántica para entender estas diferencias en las propiedades espectrales de los polisulfuros.

3.5.6. Estabilidad de los polisulfuros purificados

Se midió la absorbancia del GSSSG por espectrofotometría durante un intervalo de 60 minutos. Se graficó para determinar su estabilidad a temperatura ambiente (21°C) (Figura 35). Se puede observar que la especie GSSSG es bastante estable, transcurrido 60 minutos a temperatura ambiente su absorbancia no varía significativamente los valores de absorbancia en condiciones de pH=7.4 en buffer fosfato pH 7.4. De acuerdo a las absorbancias se descompuso solo un 4.5% del GSSSG inicial (Variación $t_{\text{final}} / t_{\text{inicial}} = 0.1500/0.1570 = 0.9554$).

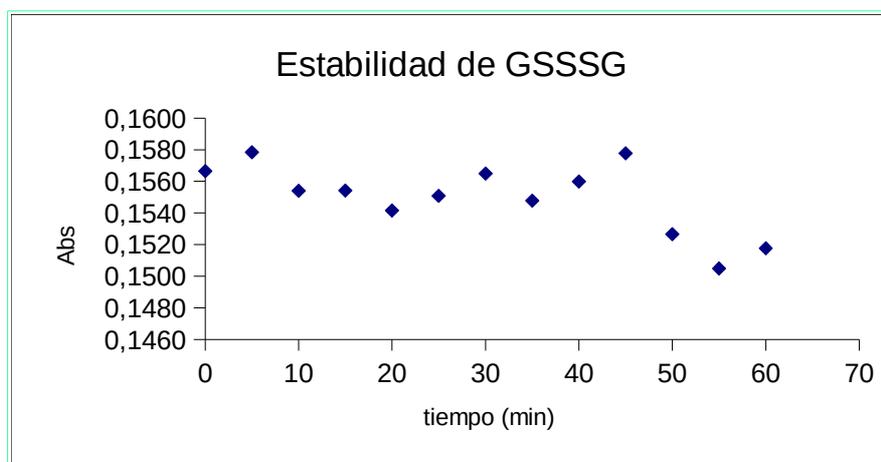
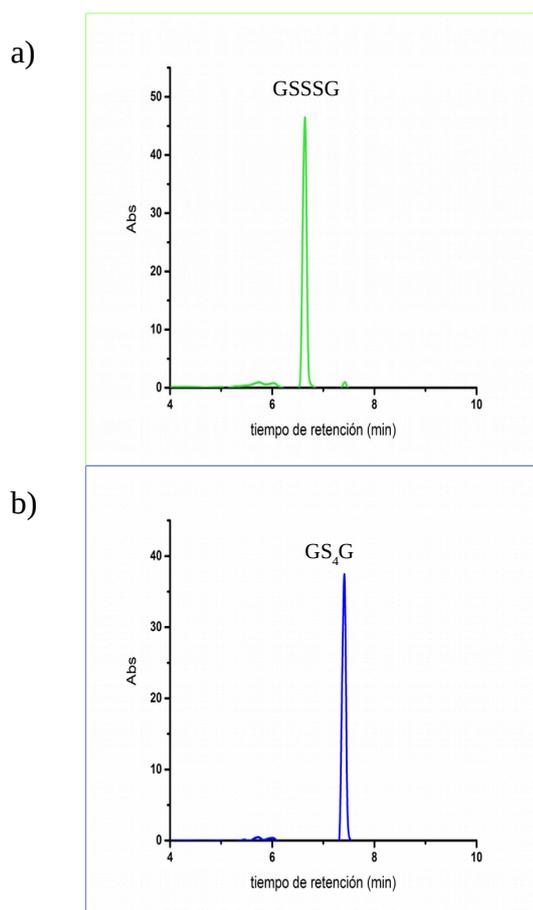


Figura 35. Estabilidad del GSSSG. Gráfico de Absorbancia (253 nm) de GSSSG vs tiempo tiempo (minutos) en buffer fosfato pH = 7.4. Se observa la estabilidad de la especie GSSSG en el tiempo.

En la figura 36 se observa los cromatogramas obtenidos para la fracción correspondiente a la GSSSG, GS₄G y GS₅G. El mismo muestra la estabilidad de dicha especie luego de 30 días de almacenamiento a -20°C en el medio ácido colectado del HPLC. En los cromatogramas de GSSSG y GS₄G no se observan picos de otras especies indicando que no ocurren reacciones entre los polisulfuros en estas condiciones. Podemos decir que en las condiciones en que se guardó el GSSSG y el GS₄G son bastantes estables. Esto nos permite conservar las especies purificadas por largo tiempo y valida los experimentos realizados con muestras que fueron almacenadas en estas condiciones durante varios meses.

Para la especie GS₅G se pueden observar en el cromatograma otros picos correspondientes a las especie GS₄G y GS₆G. Esto está indicando que en el tiempo y las condiciones que estuvo almacenada la fracción de la especie GS₅G sí ocurren reacciones generando otras especies.



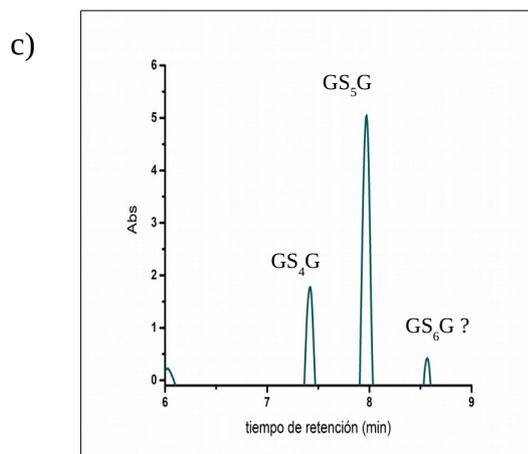


Figura 36. Cromatogramas de las especies **(a)** GSSSG, **(b)** GS_4G y **(c)** GS_5G después de 30 días de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las especies GSSSG y GS_4G no muestran degradación, los picos son los correspondientes a las especies purificadas en primera instancia. El cromatograma de GS_5G muestra otro dos picos que corresponden a GS_4G y GS_6G lo que indica que dismutan y se degrada.

La estabilidad del GSSSG y los otros polisulfuros varían seguramente por las condiciones de almacenamiento (Brown y Bowden 2022). Queda demostrado que a temperaturas bajas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) los polisulfuros son bastante estables sin la presencia de otras especies como aminas o glutatión (excepto el GS_5G). Esto permite que se pueda almacenar estas especies en frío sin que dismuten o degraden en un intervalo de tiempo amplio. Queda por demostrar si GS_5G a los 9 días se degrada como en el artículo mencionado.

4. Conclusiones

En este trabajo: a) Se sintetizó el GSSSG y otros polisulfuros de glutatión a partir de la reacción de $\text{H}_2\text{S} + \text{GSSG}$. b) Se purificó GSSSG, GS_4G y GS_5G por HPLC. c) Se determinó la identidad de estos polisulfuros por espectrometría de masa resultando para GSSG, GSSSG y GS_4G 613.14 Da, 645.13 Da y 677.1 Da respectivamente sus masas, coincidente con las masas protonadas. d) Se determinaron los espectros UV de las especies GSSG, GSSSG, GS_4G y GS_5G y sus máximos de absorción para cada una de las especies fueron 253 nm, 252 nm, 294 y 300 nm respectivamente. e) Se determinaron los coeficientes de extinción molar de las especies GSSG, GSSSG y GS_4G a 253, 253 y 294 nm, dando $275 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $1358 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $1598 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente, valores no reportados a la fecha para los polisulfuros. f) GSSSG, GS_4G resultaron bastante estables en las condiciones de trabajo y GS_5G se descompone incluso a -20C .

Perspectivas

Para comprender y abordar con mayor entendimiento los espectros UV y los coeficientes de extinción molar se propone trabajar con simulaciones cuánticas de las especies estudiadas.

Conociendo el coeficiente de extinción molar podemos determinar con mejor precisión las concentraciones de las especies GSSG y GSSSG. Sería interesante ahora determinar cuanto GSSSG se forma efectivamente en la reacción 1 en condiciones similares a las usadas por (Benchoam, Semelak, et al. 2020), a modo de completar la caracterización de esa reacción y de los equilibrios involucrados. También sería interesante determinar la constante de velocidad del GSSSG con H_2S y GSH. Se ha propuesto que esta reacción sería mucho más rápida que para el GSSG, y este argumento sustenta el mecanismo enzimático propuesto para la enzima encargada de la descomposición del H_2S , la sulfuro quinona óxido reductasa mitocondrial (SQR) (Landry, Moon et al. 2019, Landry, Moon et al. 2020). Sin embargo, la evidencia experimental aún es escasa y es necesario experimentar con modelos más accesibles. Para finalizar, consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo pueden aportar datos importantes para determinar cuestiones fundamentales de la química del GSSSG y otros polisulfuros del glutatión.

5. Referencias

1. Akaike, T., et al. (2017). "Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics." *Nature communications* **8**(1): 1-15.
2. Albert, C. F. and W. Geoffrey (1988). *Advanced inorganic chemistry*, John Wiley & Sons Incorporated.
3. Augusti, K. and P. Mathew (1974). "Lipid lowering effect of allicin (diallyl disulphide-oxide) on long term feeding to normal rats." *Experientia* **30**(5): 468-470.
4. Benaïchouche, M., et al. (1990). "Relative nucleophilicities of aryldisulphide and thiolate ions in dimethylacetamide estimated from their reaction rates with alkyl halides." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **2**(8): 1421-1424.
5. Benchoam, D., et al. (2019). "Hydrogen sulfide and persulfides oxidation by biologically relevant oxidizing species." *Antioxidants* **8**(2): 48.
6. Benchoam, D., et al. (2020). "Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide." *Journal of Biological Chemistry* **295**(46): 15466-15481.
7. Bianco, C. L., et al. (2019). "The reaction of hydrogen sulfide with disulfides: formation of a stable trisulfide and implications for biological systems." *British Journal of Pharmacology* **176**(4): 671-683.
8. Bianco, C. L., et al. (2016). "The chemical biology of the persulfide (RSSH)/perthiyl (RSS·) redox couple and possible role in biological redox signaling." *Free Radical Biology and Medicine* **101**: 20-31.
9. Bogdándi, V., et al. (2019). "Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell?" *British Journal of Pharmacology* **176**(4): 646-670.
10. Brown, E. M. and N. B. Bowden (2022). "Stabilities of Three Key Biological Trisulfides with Implications for Their Roles in the Release of Hydrogen Sulfide and Bioaccumulation of Sulfane Sulfur." *ACS omega*.
11. Burguera, E. F., et al. (2020). "Hydrogen sulfide biosynthesis is impaired in the osteoarthritic joint." *International Journal of Biometeorology* **64**(6): 997-1010.
12. Cao, X., et al. (2018). "The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling." *Biochemical Pharmacology* **149**: 20-28.
13. Cooper, C. E. and G. C. Brown (2008). "The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance." *Journal of bioenergetics and biomembranes* **40**(5): 533-539.
14. Cuevasanta, E., et al. (2012). "Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes." *PLoS one* **7**(4): e34562.
15. Cuevasanta, E., et al. (2015). "Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide*." *Journal of Biological Chemistry* **290**(45): 26866-26880.
16. Cuevasanta, E., et al. (2017). "Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides." *Archives of biochemistry and biophysics* **617**: 9-25.
17. Cuevasanta, E., et al. (2019). "Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry* **294**(37): 13593-13605.
18. Deplancke, B., et al. (2003). "Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice." *Experimental biology and medicine* **228**(4): 424-433.
19. Edwards, J. O. and R. G. Pearson (1962). "The factors determining nucleophilic reactivities." *Journal of the American Chemical Society* **84**(1): 16-24.

20. Filipovic, M. R., et al. (2018). "Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation." Chemical reviews **118**(3): 1253-1337.
21. Fogg, P. G., et al. (2001). "IUPAC-NIST solubility data series. 76. Solubility of ethyne in liquids." Journal of Physical and Chemical Reference Data **30**(6): 1693-1875.
22. Francoleon, N. E., et al. (2011). "The reaction of H₂S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H₂S biology." Archives of biochemistry and biophysics **516**(2): 146-153.
23. Hamid, H. A., et al. (2019). "Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis." Redox biology **21**: 101096.
24. Hao, G., et al. (2018). "Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy." RSC advances **8**(39): 22182-22192.
25. Ida, T., et al. (2014). "Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(21): 7606-7611.
26. Ikeda, M., et al. (2017). "Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach." Analytica chimica acta **969**: 18-25.
27. Jin, Z., et al. (2017). "Hydrogen sulfide mediates ion fluxes inducing stomatal closure in response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*." Plant and Soil **419**(1): 141-152.
28. Johnson, E. and R. Beer (1971). "Violacein." UV Atlas of Organic Compounds **5**.
29. Kawamura, S., et al. (1966). "Aralkyl Hydrodisulfides. VI. The Reaction of Benzhydryl Hydrosulfide with Several Nucleophiles." The Journal of organic chemistry **31**(6): 1985-1987.
30. Khan, S., et al. (2018). "Reactive persulfides from *Salmonella Typhimurium* downregulate autophagy-mediated innate immunity in macrophages by inhibiting electrophilic signaling." Cell chemical biology **25**(11): 1403-1413. e1404.
31. Knowles, L. M. and J. A. Milner (1998). "Depressed p34 cdc2 kinase Activity and G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells."
32. Landry, A. P., et al. (2020). "Dismantling and rebuilding the trisulfide cofactor demonstrates its essential role in human sulfide quinone oxidoreductase." Journal of the American Chemical Society **142**(33): 14295-14306.
33. Landry, A. P., et al. (2019). "A catalytic trisulfide in human sulfide quinone oxidoreductase catalyzes coenzyme a persulfide synthesis and inhibits butyrate oxidation." Cell chemical biology **26**(11): 1515-1525. e1514.
34. Levitt, M. D., et al. (1999). "Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa." The Journal of clinical investigation **104**(8): 1107-1114.
35. Libiad, M., et al. (2014). "Organization of the Human Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation Pathway*♦." Journal of Biological Chemistry **289**(45): 30901-30910.
36. Mathai, J. C., et al. (2009). "No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(39): 16633-16638.
37. Millero, F. J. (1986). "The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters." Marine Chemistry **18**(2-4): 121-147.
38. Millikin, R., et al. (2016). "The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation." Free Radical Biology and Medicine **97**: 136-147.
39. Mishanina, T. V., et al. (2015). "Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways." Nature chemical biology **11**(7): 457-464.
40. Nicholls, P. and J.-K. Kim (1982). "Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system." Canadian journal of biochemistry **60**(6): 613-623.

41. Olson, K. R. and K. D. Straub (2016). "The role of hydrogen sulfide in evolution and the evolution of hydrogen sulfide in metabolism and signaling." Physiology **31**(1): 60-72.
42. Ono, K., et al. (2021). "Cysteine Hydropersulfide Inactivates β -Lactam Antibiotics with Formation of Ring-Opened Carbothioic S-Acids in Bacteria." ACS Chemical Biology **16**(4): 731-739.
43. Rao, G. S. and G. Gorin (1959). "Reaction of cystine with sodium sulfide in sodium hydroxide solution." The Journal of organic chemistry **24**(6): 749-753.
44. Renga, B. (2011). "Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE)." Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued) **10**(2): 85-91.
45. Riahi, S. and C. N. Rowley (2014). "Solvation of hydrogen sulfide in liquid water and at the water-vapor interface using a polarizable force field." The Journal of Physical Chemistry B **118**(5): 1373-1380.
46. Riener, C. K., et al. (2002). "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4, 4'-dithiodipyridine." Analytical and bioanalytical chemistry **373**(4): 266-276.
47. Saund, S. S., et al. (2015). "The chemical biology of hydropersulfides (RSSH): Chemical stability, reactivity and redox roles." Archives of biochemistry and biophysics **588**: 15-24.
48. Sawa, T., et al. (2018). Reactive cysteine persulphides: occurrence, biosynthesis, antioxidant activity, methodologies, and bacterial persulphide signalling. Advances in Microbial Physiology, Elsevier. **72**: 1-28.
49. Scuffi, D., et al. (2016). "Gasotransmitters and stomatal closure: Is there redundancy, concerted action, or both?" Frontiers in Plant Science **7**: 277.
50. Sparnins, V. L., et al. (1986). "Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse."
51. Sundaram, S. G. and J. A. Milner (1993). "Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumor cells in culture." Cancer letters **74**(1-2): 85-90.
52. Sundaram, S. G. and J. A. Milner (1996). "Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease **1315**(1): 15-20.
53. Takahashi, N., et al. (2017). "Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion." Nucleic acids research **45**(1): 435-445.
54. Valentine, W. N., et al. (1987). "Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol: possible regulatory role." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(5): 1394-1398.
55. Vitvitsky, V., et al. (2012). "High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations." Antioxidants & redox signaling **17**(1): 22-31.
56. Wang, J., et al. (2017). Combining Knowledge with Deep Convolutional Neural Networks for Short Text Classification. IJCAI.
57. Warnakula, I. K., et al. (2020). "Evaluation of the long-term storage stability of the cyanide antidote: dimethyl trisulfide and degradation product identification." ACS omega **5**(42): 27171-27179.
58. Wu, Z., et al. (2022). "Hydropersulfides Inhibit Lipid Peroxidation and Protect Cells from Ferroptosis." Journal of the American Chemical Society **144**(34): 15825-15837.
59. Yamanishi, T. and S. Tuboi (1981). "The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver γ -cystathionase." The Journal of Biochemistry **89**(6): 1913-1921.
60. Yang, C.-t., et al. (2020). "S-persulfidation: chemistry, chemical biology, and significance in health and disease." Antioxidants & redox signaling **33**(15): 1092-1114.

61. Yoo, M., et al. (2014). "Validated HPLC method and temperature stabilities for oil-soluble organosulfur compounds in garlic macerated oil." Journal of chromatographic science **52**(10): 1165-1172.
62. Zhang, B., et al. (2012). "Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(39): 15734-15739.
63. Zhang, D., et al. (2014). "Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique." Angewandte Chemie International Edition **53**(2): 575-581.
64. Zhang, T., et al. (2021). "ATP exposure stimulates glutathione efflux as a necessary switch for NLRP3 inflammasome activation." Redox biology **41**: 101930.

6. Anexo

GSSSG por HPLC

Cálculo de moles de GSH estándar:

- 1mM. 200mL - 216 μ L.

$$X = 0.9259 / 2 = x = 463 \mu\text{M}$$

- N° moles de GSH = 10 μ L . 463 μ M

1) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 1148

$$x \text{-----} 71.6 \quad x = 2.9 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 28.9 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 57.8 \mu\text{M}$$

$$57.8 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 124.7 = [\text{GSH}] = 124.7 \mu\text{M} \text{-----} [\text{GSSSG}] = 62.4 \mu\text{M}$$

2) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 1148

$$x \text{-----} 71.5 \quad x = 2.88 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 28.8 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 57.6 \mu\text{M}$$

$$57.6 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 124.4 = [\text{GSH}] = 124.4 \mu\text{M} \text{-----} [\text{GSSSG}] = 62.2 \mu\text{M}$$

3) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 1148

$$x \text{-----} 70.6 \quad x = 2.84 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 28.5 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 56.9 \mu\text{M}$$

$$56.9 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 123 = [\text{GSH}] = 124.7 \text{ Mm} \text{-----} [\text{GSSSG}] = 61.5 \text{ Mm}$$

$$\epsilon_1 = \text{Abs}_{253} = 0.0845 / 62.4 \times 10^{-6} \text{ M} = 1351 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_2 = \text{Abs}_{253} = 0.0845 / 62.2 \times 10^{-6} \text{ M} = 1353 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_1 = \text{Abs}_{253} = 0.0845 / 61.5 \times 10^{-6} \text{ M} = 1371 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Tabla 2. Tabla con los valores de [GSH], [GSSSG] y absorptividad molar obtenida para GSSSG. Determinación de la absorptividad del GSSSG.

Exp	Tiempo de retención (min)	Área	[GSH] μM	[GSSSG] μM	Absorptividad ^{GSSSG} _{253nm} $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Área GSH std
1	7.7	71.6	124.7	62.4	1351	1118
2	7.7	71.5	124.6	62.3	1353	1325.2
3	7.7	70.5	126	61.5	1371	1059.2
						Promedio 1148.05

El promedio de la absorptividad a 253 nm es de **1358.3 \pm 11 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$** para el GSSSG

GS₄G por HPLC

Calculo de moles de GSH estándar

- 1mM. 200μL- 216μL.

$$X = 0.9259 / 2 = x = 463 \mu\text{M}$$

- N° moles de GSH= 10μL . 463 μM

1) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 1148

$$x \text{-----} 66.7 \quad x = 2.7 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 27 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 54 \mu\text{M}$$

$$54 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 116.64 = [\text{GSH}] = 116.64 \mu\text{M} \text{-----} [\text{GSSSSG}] = 58.32 \mu\text{M}$$

2) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 1148

$$x \text{-----} 66.5 \quad x = 2.68 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 26.8 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 53.6 \mu\text{M}$$

$$53.6 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 115.8 = [\text{GSH}] = 115.8 \mu\text{M} \text{-----} [\text{GSSSSG}] = 57.8 \mu\text{M}$$

3) 4.63x 10⁻⁹ moles ----- área 114

$$x \text{-----} 66.2 \quad x = 2.67 \times 10^{-10} \text{ moles} / 10 \times 10^{-6} \text{ L} = 26.7 \mu\text{M} \times \text{factor de dilución} = 53.4 \mu\text{M}$$

$$53.5 \mu\text{M} \text{-----} 100 \mu\text{L}$$

$$x \text{-----} 216 \mu\text{L} \quad x = 123 = [\text{GSH}] = 115.34 \mu\text{M} \text{-----} [\text{GSSSSG}] = 57.7 \mu\text{M}$$

$$\epsilon_1 = \text{Abs}_{294} = 0.0926 / 58.32 \times 10^{-6} \text{ M} = 1587.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_2 = \text{Abs}_{294} = 0.0926 / 57.8 \times 10^{-6} \text{ M} = 1602.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_1 = \text{Abs}_{294} = 0.0926 / 57.7 \times 10^{-6} \text{ M} = 1604.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Tabla 3. con los valores de [GSH], [GSSSSG] y absorptividad molar obtenida para GSSSSG.

Exp	Tiempo de retención (min)	Área	[GSH] μM	[GSSSSG] μM	Absortividad ^{GS₄G} _{294 nm} M ⁻¹ cm ⁻¹	Área GSH std
1	7.7	66.7	116.64	58.32	1587.8	1118
2	7.7	66.5	115.8	57.8	1602.1	1325.2
3	7.7	66.2	115,34	57.7	1604.8	1059.2
						1090.8
						Promedio= 1148.05

$$\text{Abs}_{297} = 0,0926 \quad \text{Promedio absorptividad a 294 nm} = 1598 \pm 7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$