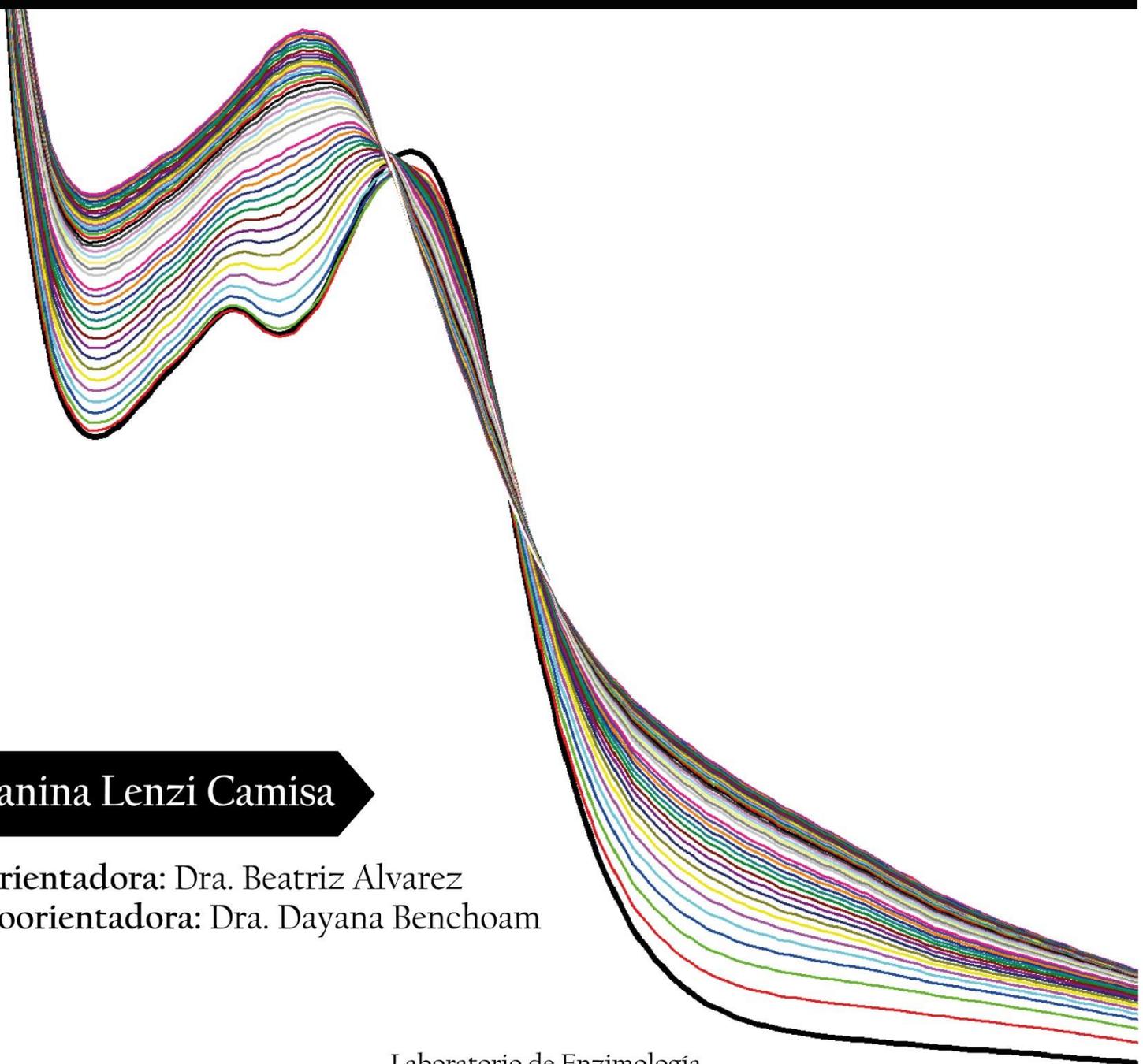


Tesina para la obtención del título de Licenciada en Bioquímica
de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Reacción de omeprazol y H_2S



Janina Lenzi Camisa

Orientadora: Dra. Beatriz Alvarez
Coorientadora: Dra. Dayana Benchoam

Laboratorio de Enzimología
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Fecha de entrega: 26 de febrero de 2024

Índice

1	Abreviaturas	5
2	Resumen.....	6
3	Introducción	7
3.1	Omeprazol.....	7
3.1.1	Descomposición del omeprazol a pH ácido	8
3.1.2	Reacción de omeprazol con tioles de bajo peso molecular	10
3.1.3	Secreción de ácido clorhídrico en el estómago y su regulación.....	11
3.1.4	Bomba de protones (H^+,K^+ -ATPasa)	13
3.1.5	Inhibición de H^+,K^+ -ATPasa	15
3.1.6	Farmacología del omeprazol	17
3.1.7	Usos no convencionales del omeprazol	18
3.2	Sulfuro de hidrógeno.....	19
3.2.1	Propiedades fisicoquímicas del H_2S	19
3.2.2	Reactividad del H_2S	20
3.2.3	Producción endógena de H_2S	21
3.2.4	Catabolismo.....	24
3.2.5	Persulfuros	25
3.2.6	Roles biológicos del H_2S y de los persulfuros	26
3.2.7	El H_2S y el estómago	27
3.3	Hipótesis.....	29
4	Objetivos	30
4.1	Objetivo general.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5	Materiales y métodos	31
5.1	Soluciones	31
5.2	Caracterización de reacciones por espectrofotometría UV-Vis.....	31
5.2.1	Reacciones de omeprazol con H_2S o BME a pH 4.5.....	31
5.2.2	Estabilidad de la sulfenamida a pH 7.5	32
5.3	HPLC	33
5.4	Espectrometría de masas.....	34
5.5	Cianólisis fría	34
6	Resultados y discusión	36
6.1	Cinética de la reacción de omeprazol y H_2S	36
6.1.1	Espectro de absorbancia UV-Vis de omeprazol en agua.....	36
6.1.2	Descomposición de omeprazol a pH ácido	37
6.1.3	Descomposición del omeprazol en presencia de BME	38

6.1.4	Estabilidad de la sulfenamida a pH cercano a la neutralidad	42
6.1.5	Reacción de omeprazol con H ₂ S.....	45
6.2	HPLC	51
6.3	Espectrometría de masas.....	55
6.4	Cianólisis fría	58
7	Conclusiones.....	63
8	Agradecimientos	64
9	Referencias.....	66

1 Abreviaturas

APS	Adenosina 5'-fosfosulfato
BME	β -mercaptoetanol
CBS	Cistationina β -sintasa
CSE	Cistationina γ -liasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
GIADI	Arginina deiminasa giardial
MST	3-Mercaptopiruvato azufretransferasa
NO [*]	Óxido nítrico
PAPS	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
RSH	Tiol
RSOH	Ácido sulfénico
RSR	Tioéter
RSSH	Persulfuro
RSSR	Disulfuro
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina

2 Resumen

El omeprazol es un profármaco que actúa inhibiendo la bomba de protones (H^+,K^+ -ATPasa) de las células parietales del estómago. Químicamente es un sulfóxido. A pH ácido produce un ácido sulfénico en equilibrio con una sulfenamida, cuya reacción con un tiol (RSH) forma un disulfuro mixto (RSSR') que, en presencia de reductor, decae a un tioéter (RSR). Considerando que el sulfuro de hidrógeno (H_2S/HS^-) reacciona con los ácidos sulfénicos formando persulfuros (RSSH), se hipotetiza que la sulfenamida de omeprazol podría reaccionar con H_2S y formar un derivado persulfuro. Este último podría decaer a un disulfuro para finalmente producir el tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol. Alternativamente, la reacción del persulfuro con otra molécula de H_2S podría dar el tioéter. La reacción de omeprazol con exceso de H_2S se estudió en amortiguador citrato a pH 4.5 y 25 °C, mediante espectrofotometría UV-Vis. Se observó la aparición de turbiedad, que fue revertida por la adición del reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y que no fue observada con omeprazol solo ni en presencia de β -mercaptoetanol, sugiriendo formación de polisulfuros y azufre elemental. Los productos del omeprazol y H_2S fueron analizados por HPLC de fase reversa, detectándose un pico que también estaba presente en muestras de omeprazol con reductor TCEP. Sin embargo, no se detectaron picos correspondientes al tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol, según el estándar. Los experimentos de espectrometría de masas evidenciaron la formación del tioéter, mientras que el método de cianólisis fría demostró la formación de compuestos con azufre sulfano (átomo de azufre unido a dos átomos de azufre o a un átomo de azufre e hidrógeno ionizable). Si bien no es probable que estas reacciones ocurran en contexto fisiológico, los resultados demuestran que el omeprazol y el H_2S reaccionan produciendo el tioéter derivado del omeprazol, polisulfuros y azufre elemental.

Palabras clave: Sulfuro de hidrógeno, persulfuros, omeprazol, ácido sulfénico.

3 Introducción

3.1 Omeprazol

El omeprazol es un profármaco utilizado en el tratamiento del reflujo gastroesofágico y la úlcera péptica. Actúa suprimiendo la secreción de ácido en las células parietales del estómago al inhibir a la enzima H^+,K^+ -ATPasa, o bomba de protones. Inicialmente, las patologías relacionadas a la acidez estomacal eran tratadas mediante el uso de antiácidos, que neutralizaban momentáneamente la acidez, y quirúrgicamente, mediante reducción gástrica y vagotomía. Posteriormente, se desarrollaron fármacos antagonistas de histamina H_2 , que proporcionan una inhibición efectiva de la secreción de ácido pero de corta duración. En la década de 1960, la compañía Astra comenzó a desarrollar inhibidores específicos de la bomba de protones, y en 1988, lanzó el omeprazol al mercado en Europa con el nombre de Losec. Un año más tarde fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos y ha sido comercializado a partir de 1990 en dicho país con el nombre comercial Prilosec, siendo el omeprazol el primer inhibidor de la bomba de protones utilizado clínicamente [1]. El omeprazol es una mezcla racémica de dos isómeros ópticos (enantiómeros con configuración R y S) (Figura 1). Posteriormente se supo que, si bien ambas configuraciones son igual de efectivas debido a que se descomponen en su forma activa (sulfenamida) en medio ácido, la biodisponibilidad del isómero S (esomeprazol) es mayor, debido a que se metaboliza más lento [2]. Este descubrimiento llevó al lanzamiento de dicho isómero al mercado en el año 2000 por la compañía AstraZeneca, bajo el nombre de Nexium [1].

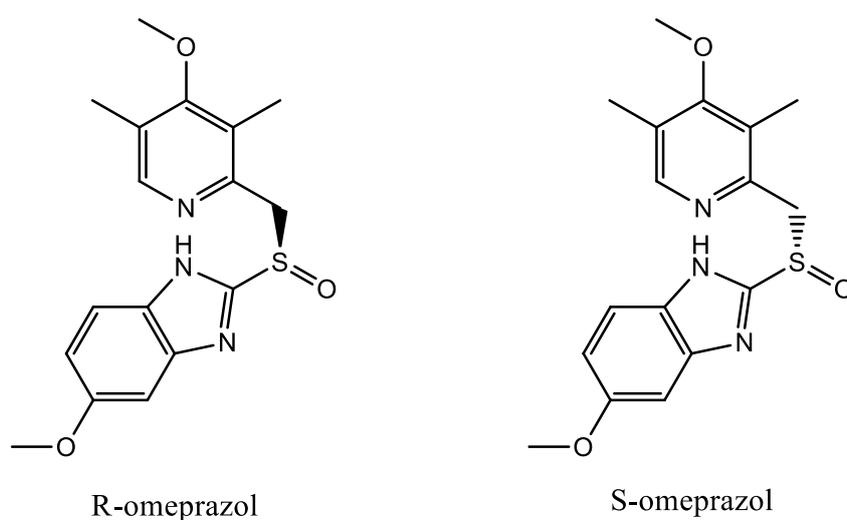


Figura 1. Estructura del omeprazol. Estructuras de los isómeros R (izquierda) y S (derecha) del omeprazol.

Químicamente, el omeprazol es un sulfóxido ($R_2S=O$) que en medio ácido produce un ácido sulfénico ($RSOH$) en equilibrio con una sulfenamida ($RSNR_2$). La sulfenamida es capaz de reaccionar con los tioles (RSH) presentes en residuos de cisteína críticos de la bomba de protones de las células parietales del estómago, formando un disulfuro mixto ($RSSR'$) que en presencia de un exceso de tioles forma un tioéter (RSR). La modificación covalente de la enzima por la formación del disulfuro mixto produce su inhibición, mientras que en condiciones normales, la enzima libera H^+ hacia el lumen del estómago manteniendo el pH ácido [3]. Estas reacciones se desarrollarán en las siguientes secciones.

3.1.1 *Descomposición del omeprazol a pH ácido*

En 1989, investigadores suecos liderados por Arne Brändström pertenecientes a AB Hässle, subsidiaria de Astra, publicaron seis artículos en serie en *Acta Chemica Scandinavica* que sentaron las bases de la comprensión de la descomposición del omeprazol a pH ácido y su reactividad con tioles [4–9]. La formación de la sulfenamida a expensas de omeprazol a pH ácido se esquematiza en la Figura 2 e involucra la formación de un intermediario spiro dihidrobencimidazol, cuya formación es el paso limitante de la velocidad de reacción, y posteriormente de un ácido sulfénico muy inestable. A pH neutro, el proceso es reversible. [4].

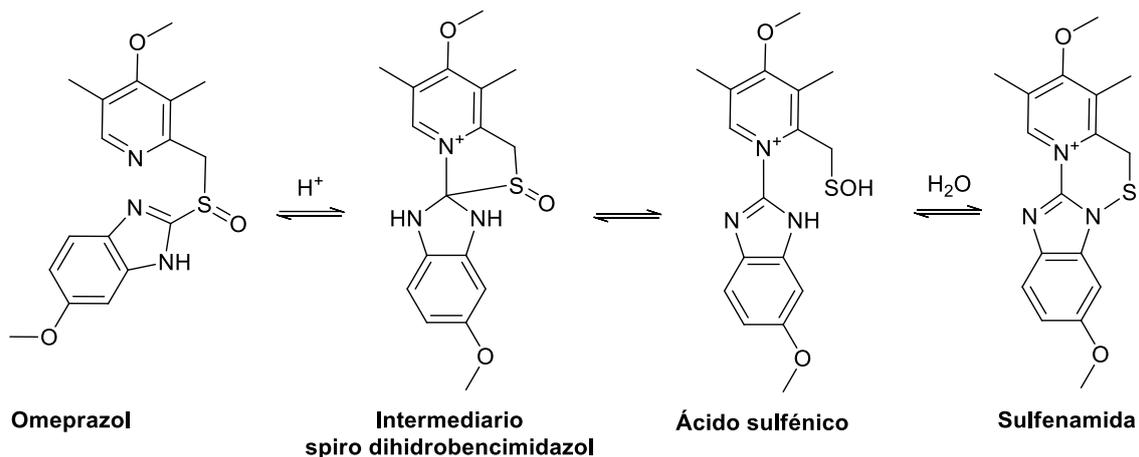


Figura 2. Mecanismo de la descomposición de omeprazol en medio ácido y formación del ácido sulfénico y sulfenamida derivados. Comienza con la protonación del anillo bencimidazol del omeprazol y el consecuente ataque nucleofílico del nitrógeno de la piridina sobre el carbono 2 del anillo bencimidazol deficiente en electrones, para formar un intermediario con un ion piridonio y un dihidrobencimidazol (intermediario spiro dihidrobencimidazol). La aromatización de dicha especie forma un ácido sulfénico muy inestable. Luego, el nitrógeno del bencimidazol ataca al átomo de azufre produciendo la sulfenamida. Figura adaptada de [4].

Las reacciones del omeprazol pueden seguirse por cambios en el espectro UV-Vis. El espectro de absorbancia del omeprazol posee un máximo a 300 nm y un pico a 275 nm, mientras que la sulfenamida correspondiente presenta picos a 271 y 357 nm (Figura 3) [10]. La absorción de la sulfenamida a longitudes de onda mayores que el omeprazol se debe a la mayor conjugación de la molécula [7].

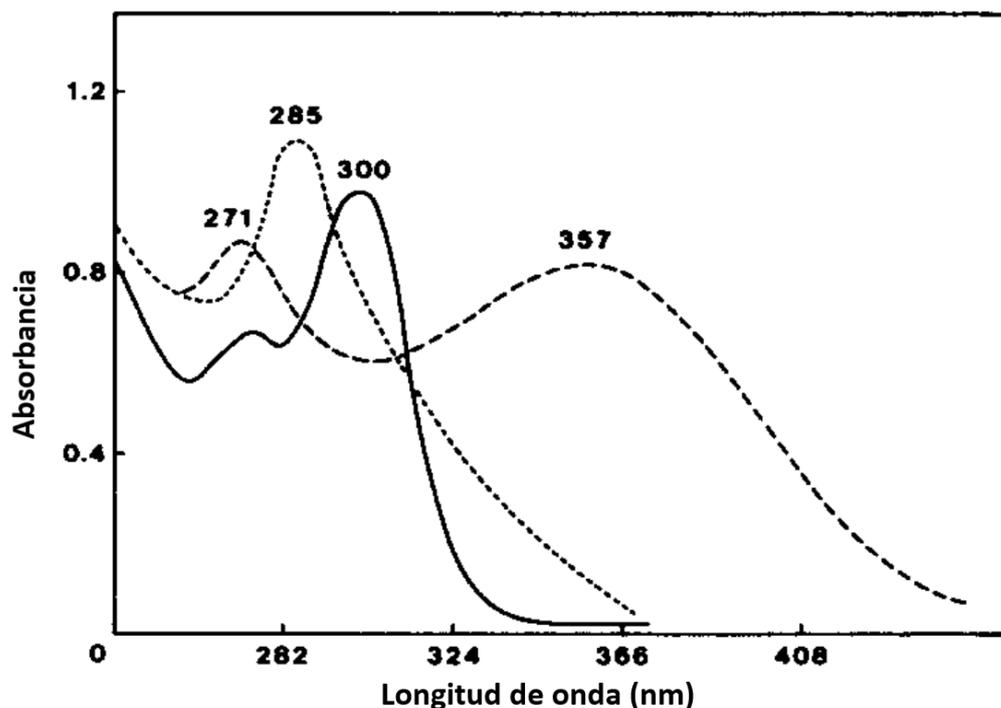


Figura 3. Espectros de absorción UV-Vis de omeprazol y sus derivados. Espectros de omeprazol (70 μ M) preincubado durante 30 min en agua (línea continua) o en HCl 0.1 N (línea discontinua). Espectro de la solución de omeprazol en HCl inmediatamente después de ser incubada con β -mercaptoetanol (BME, 70 μ M) (línea punteada). Figura adaptada de [10].

3.1.2 Reacción de omeprazol con tioles de bajo peso molecular

La reacción de descomposición del omeprazol en medio ácido en presencia de tioles de bajo peso molecular ha sido caracterizada utilizando el tiol β -mercaptoetanol (BME) [5]. Se trata de un proceso irreversible en el cual se obtiene un disulfuro mixto que, en presencia de un exceso de tioles, forma un nuevo disulfuro (RSSR) y un tioéter. Este último puede reaccionar nuevamente con un tiol para formar otro tioéter (Figura 4) [4,7]. Particularmente, el disulfuro mixto formado en la reacción de la sulfenamida con el tiol BME presenta un pico de absorción relativamente ancho con un máximo a 285 nm (Figura 3) [10].

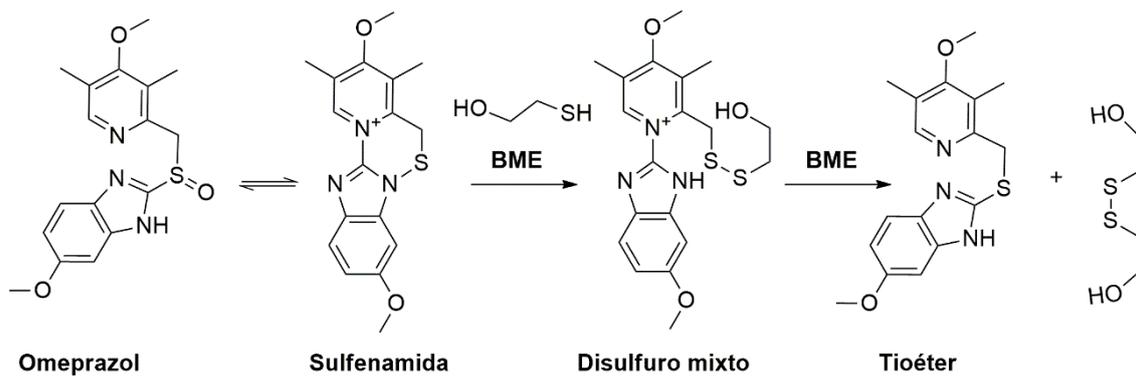


Figura 4. Reacción de omeprazol con tioles. En medio ácido, la sulfenamida derivada del omeprazol puede reaccionar con el tior β-mercaptoetanol (BME), para formar un disulfuro mixto que al reaccionar nuevamente con BME formará otro disulfuro y un tioéter, que puede reaccionar con otra molécula de BME para formar un nuevo tioéter. Figura adaptada de [7].

3.1.3 Secreción de ácido clorhídrico en el estómago y su regulación

El estómago humano se divide en tres regiones: cardias, cuerpo y antro (Figura 5). En el cuerpo se encuentran las glándulas oxínticas, en las cuales está presente la mayor parte de las células secretoras de ácido clorhídrico (HCl), denominadas células parietales u oxínticas [11,12]. El HCl secretado por las células parietales hacia la luz gástrica es responsable del bajo pH que facilita la digestión de los alimentos, genera protección frente a organismos patógenos y promueve la absorción de minerales como el fosfato de calcio y el hierro [11].

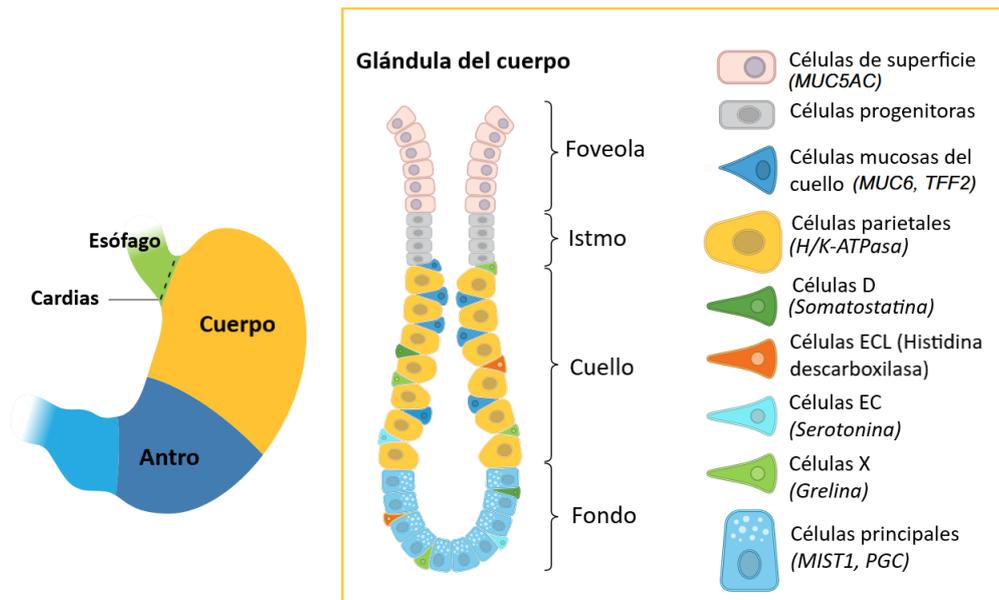


Figura 5. Glándulas oxínticas del estómago. **Izquierda:** Representación de la anatomía del estómago humano, conformado por las regiones cuerpo, antro y cardias. **Derecha:** Representación de la glándula oxíntica del cuerpo. Se divide en regiones denominadas foveola, istmo, cuello y fondo. La foveola está formada por células de superficie, mientras que el istmo contiene células progenitoras. El cuello está conformado por células parietales, mucosas, D (secretoras de somatostatina), X (secretoras de grelina), EC (secretoras de serotonina) y ECL (similares a enterocromafines, secretoras de histamina). El fondo contiene células principales, secretoras de pepsinógeno [11,13]. Figura adaptada de [11].

La regulación de la producción de ácido en las células parietales está mediada por receptores de histamina (H_2), de gastrina (CCK_2) y muscarínicos de acetilcolina (M_3), que se encuentran acoplados a proteína G (Figura 6) [11]. Los receptores CCK_2 y M_3 son activados por gastrina y acetilcolina, respectivamente. Actúan mediante la activación de la fosfolipasa C, que provoca la liberación de Ca^{2+} intracelular y la consecuente estimulación de la liberación de H^+ por la bomba de protones [11,14]. Por otro lado, la secreción de ácido es activada por histamina, una amina generada por la enzima histidina descarboxilasa que se encuentra en los mastocitos del cuerpo gástrico y en las células similares a las enterocromafines, que generalmente se encuentran junto a las células parietales [15]. La liberación de histamina es activada por gastrina a través del receptor CCK_2R , así como también por el péptido activador de adenilato ciclasa neuronal pituitaria (PACAP), mediante el receptor PAC_1R [16]. Por otro lado, dicha secreción es inhibida por somatostatina y galanina, a través de los receptores SST_2 y Gal_1 , respectivamente [17]. Los receptores H_2 al unirse a histamina actúan activando a la adenilato ciclasa, la cual aumenta la concentración de AMPc intracelular, que a su vez activa a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), siendo esta última la responsable de potenciar la actividad de la bomba de protones [18].

Además, en las células parietales existen receptores inhibidores de la secreción de ácido, entre ellos los receptores GLP-1R, NTS₂, EGFR y los receptores acoplados a proteína G inhibitoria de la adenilato ciclasa (IP, EP₃, CRF₂ y SST₂) [11]. La inhibición de la enzima se encuentra mediada además por óxido nítrico (NO^{*}), a través de la enzima guanilato ciclasa soluble, que aumenta la concentración de GMPc [19].

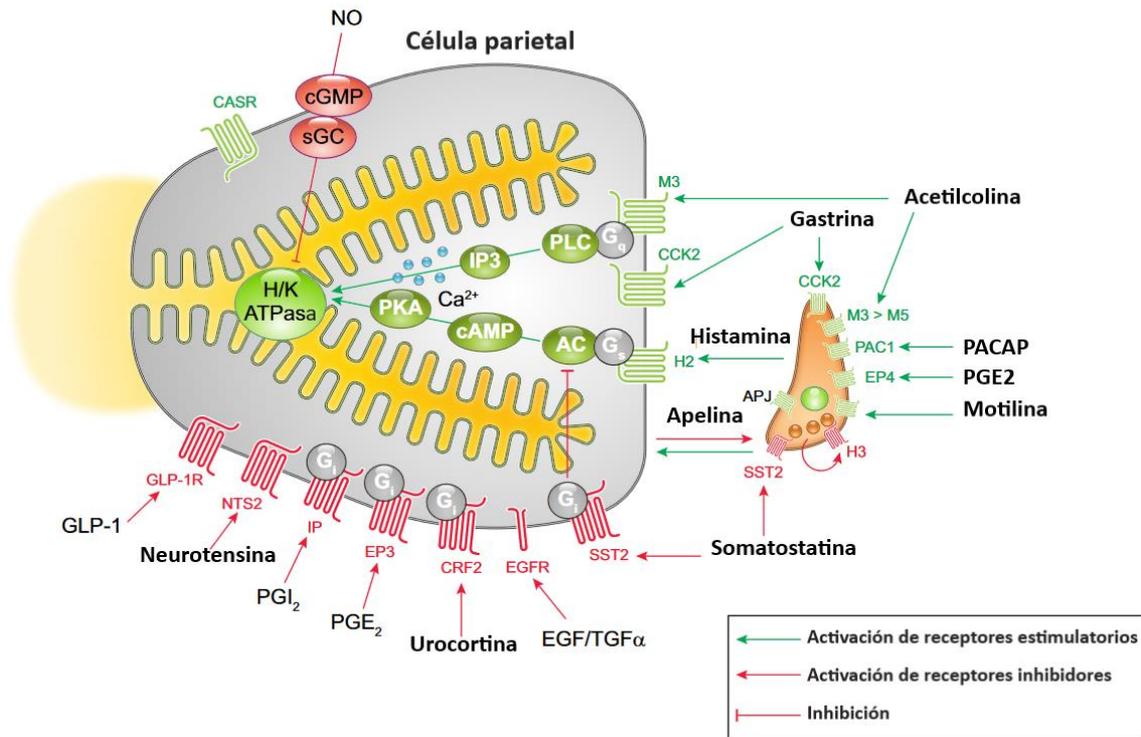


Figura 6. Regulación de la secreción de H⁺ en las células parietales. Activación de los receptores estimulatorios muscarínicos de acetilcolina (M₃), de gastrina (CCK₂) y de histamina (H₂) acoplados a proteína G (flechas verdes). Inhibición mediada por óxido nítrico (NO^{*}) (línea roja), así como la mediada por los receptores inhibidores GLP-1R, NTS₂, EGFR y acoplados a proteína G inhibitoria de la adenilato ciclasa (IP, EP₃, CRF₂ y SST₂) (flechas rojas). Figura adaptada de [11].

3.1.4 Bomba de protones (H⁺,K⁺-ATPasa)

La membrana plasmática apical de la célula parietal se caracteriza por presentar una serie de estructuras en forma de canales (canalículos), que consisten en invaginaciones que se proyectan desde la superficie hacia el interior celular conectados entre sí. Cuando la célula se encuentra en reposo, dichos canales están revestidos por microvellosidades cortas y en el citoplasma celular se localizan estructuras (tubulovesículas) que contienen a la bomba de protones. Al

activarse la secreción ácida, la célula sufre cambios morfológicos a partir de los cuales presentará canalículos expandidos con microvellosidades alargadas [20,21]. Dicho cambio morfológico ocurre mediante la fusión de las tubulovesículas con la membrana apical [22]. La fusión provoca que la bomba de protones que se encontraba en las tubulovesículas se ubique en los canalículos expandidos (Figura 7) [11].

La bomba de protones pertenece a la familia de ATPasas tipo P_2 , junto a la Na^+,K^+ -ATPasa. Se caracterizan por catalizar el bombeo del catión H^+ o Na^+ hacia el exterior de la célula, mediante su intercambio con el catión K^+ [23]. La bomba de protones es una proteína integral de membrana que se encuentra en las células parietales del estómago y, en menor medida, en la médula renal [11,21]. Es un heterodímero. Cuenta con una subunidad α catalítica formada por diez segmentos transmembrana y un grupo de residuos carboxílicos intramembrana, responsable de la secreción de ácido en la enzima activa. A su vez, la subunidad β consiste en un segmento transmembrana cuyo extremo amino terminal se encuentra en el citoplasma, mientras que el dominio extracelular contiene sitios de N-glicosilación importantes para su ensamblaje y maduración [21].

El intercambio de cationes H^+ y K^+ ocurre a expensas de la hidrólisis de ATP, provocando cambios conformacionales en la bomba de protones que modifican los sitios de unión a iones. La enzima en su forma activa se ubica en las microvellosidades de los canalículos secretores expandidos de las células parietales del estómago y cataliza el intercambio de iones K^+ por H^+ (Figura 7) [11].

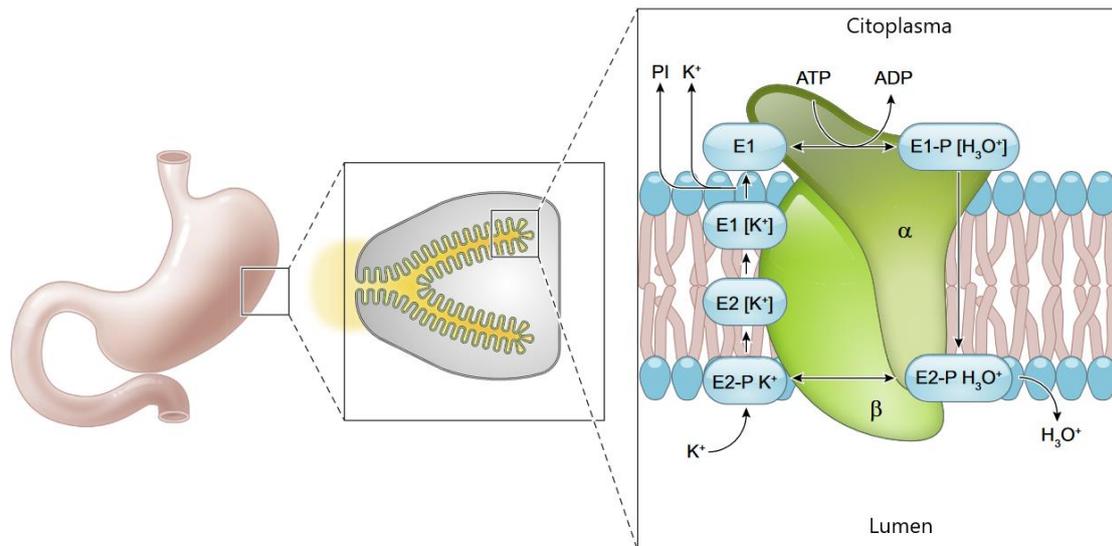


Figura 7. Ubicación y ciclo catalítico de la bomba de protones. La enzima se localiza en las tubulovesículas de la célula parietal en reposo, mientras que en su forma activa se encuentra en los canalículos secretores expandidos. A su vez ocurrirán cambios conformacionales en la enzima, modificando su sitio de unión a iones. La subunidad catalítica de la enzima en su conformación E_1 , unida a un H^+ hidratado (ion hidronio, H_3O^+), es fosforilada por $MgATP$, provocando que el sitio de unión a iones que se encontraba orientado hacia el citoplasma se altere exponiendo al H^+ hacia la región extracitoplasmática, lo que se conoce como conformación $E_1P H_3O^+$. Luego, la enzima adoptará la configuración $E_2P H_3O^+$ en la cual el sitio de unión a iones se orienta hacia la luz gástrica, liberando al H^+ y uniéndose al ion K^+ (conformación $E_2P K^+$). Posteriormente ocurre la desfosforilación de la subunidad catalítica, produciendo la conformación $E_2 K^+$, que dará lugar a $E_1 K^+$ al posicionar al K^+ frente al citoplasma. La posterior unión de $MgATP$ provoca la liberación de K^+ del sitio de unión a iones [11]. La transición de la configuración E_2 a E_1 ha sido estudiada en la isoforma $Na^+,K^+-ATPasa$ y se ha postulado como el paso limitante de la velocidad [24]. Figura adaptada de [11].

3.1.5 Inhibición de $H^+,K^+-ATPasa$

Inicialmente, el tratamiento de patologías asociadas a la acidez estomacal consistía en el uso de antagonistas de los receptores de histamina H_2 , debido a su participación en la activación de la producción de ácido a través de histamina. Sin embargo, la inhibición de la secreción ejercida por los antagonistas de H_2 presenta un efecto a corto plazo. Posteriormente se implementó el uso de inhibidores de la bomba de protones, el mediador final de la secreción de ácido en las células parietales [21]. Si bien existen inhibidores reversibles e irreversibles de la enzima, los primeros aún no han sido aprobados para uso médico. Los inhibidores irreversibles que se han desarrollado son el omeprazol, pantoprazol, lansoprazol y rabeprazol, y comparten la característica de ser piridinmetilsulfonilbencimidazoles sustituidos (**Figura 8**) [21,25]. La principal ventaja de los inhibidores irreversibles radica en su capacidad de unirse a la enzima covalentemente, pues forman enlaces disulfuro con el tiol de la cisteína 813 de la subunidad α

catalítica de la bomba de protones, manteniendo a la bomba en su configuración E₂. Por otro lado, existen uniones adicionales a cisteínas expuestas a la luz, como la cisteína 892 que interacciona con omeprazol [11,21,26]. Estos inhibidores presentan un grupo piridina cuyo nitrógeno puede estar protonado confiriéndole carga a la molécula a pH ácido, de esta manera pueden ubicarse en el medio ácido del canalículo secretor de la célula parietal [25]. A pH ácido también puede ocurrir la protonación del nitrógeno del bencimidazol, que aumenta la reactividad nucleofílica del carbono adyacente y la formación de la sulfenamida (Figura 2). La sulfenamida es la especie que reacciona irreversiblemente con los tioles de los residuos de cisteína de la bomba de protones formando disulfuros mixtos e inhibiendo la enzima, por esta razón es la forma activa del fármaco [4].

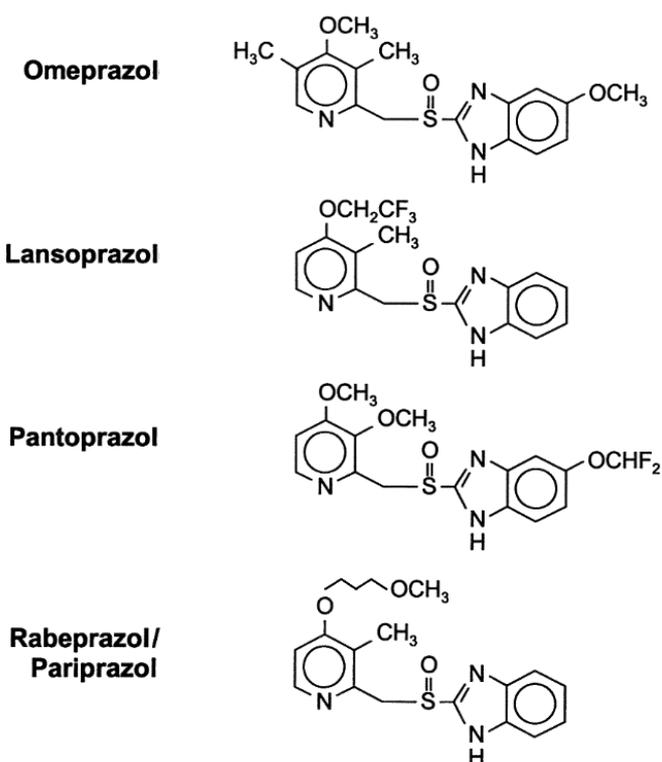


Figura 8. Inhibidores covalentes de la bomba de protones. Estructuras de omeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol. Figura adaptada de [25].

La protonación del nitrógeno del grupo piridina de la sulfenamida le confiere una carga positiva que le impide atravesar las membranas de las células parietales y de otras células [4]. Por esta razón, el omeprazol debe ingresar a la circulación en su forma inactiva para que logre alcanzar el canalículo secretor de la célula parietal y una vez allí descomponerse para producir la sulfenamida. Debido a esto y para de evitar que la sulfenamida reaccione con otros tioles, de

modo que su reacción ocurra específicamente con la cisteína de la bomba de protones, el profármaco es administrado en forma de comprimidos con un recubrimiento gastrorresistente que impide la activación del omeprazol por el ácido gástrico, logrando que sea absorbido en el duodeno en su forma inactiva. A su vez, dicho recubrimiento debe disolverse a pH alcalino en el duodeno [21,25]. La formulación de las cápsulas de Prilosec está compuesta por celulosa, hidrógeno fosfato disódico, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, lactosa, manitol y laurilsulfato de sodio. Presentan además una cubierta de gelatina, dióxido de titanio, óxido de hierro, isopropanol, alcohol butílico, entre otros compuestos inactivos. Dichos datos fueron obtenidos a partir de la ficha técnica reportada por la FDA.

Una vez que el omeprazol se absorbe en el duodeno, pasa de la sangre al citoplasma de la célula parietal del estómago, posiblemente mediante difusión simple o facilitada. Si la célula está secretando ácido, el omeprazol se protona y su forma cargada positivamente se acumula en el canalículo secretor [21,25]. La vida media del omeprazol en plasma es de 1 hora, sin embargo, la sulfenamida permanece en su sitio de acción luego de la eliminación del omeprazol del compartimento sanguíneo. Además, se ha demostrado que el efecto antisecretor de dicho fármaco no se debe a su concentración plasmática, sino a su concentración en el sitio de acción [25,27]. Se ha demostrado que las dosis iguales o superiores a 20 mg del fármaco por día son suficientes para inhibir la secreción de ácido en la mayoría de los pacientes [28]. Se ha evidenciado que la restauración de la secreción de ácido ocurre a las 72 horas luego de finalizado el tratamiento con omeprazol, independientemente de la duración del tratamiento. Considerando además que la vida media de las células parietales es de 90 días, se ha sugerido que la recuperación de la secreción de ácido se debe a la síntesis *de novo* de la enzima. Sin embargo, esta inhibición podría revertirse en presencia de tioles como BME y glutatión [25,27].

3.1.6 Farmacología del omeprazol

El omeprazol es utilizado en el tratamiento de patologías vinculadas a la acidez estomacal, como el reflujo gastroesofágico y la úlcera péptica. Esto se debe a que la supresión de la acidez facilita la regeneración de la mucosa fomentando la cicatrización de la úlcera [29]. Por otro lado, una de las causas de dicha patología es la infección por el patógeno *Helicobacter pylori* [30]. Se trata de una bacteria microaerofílica gramnegativa con distintos mecanismos de patogenicidad, como la colonización de la mucosa y la expresión de factores de virulencia, que le permiten evadir los mecanismos de defensa del hospedador. Un factor clave en la colonización es la presencia de la enzima ureasa en el microorganismo, que cataliza la producción de dióxido de carbono y

amoníaco a partir de urea, permitiéndole neutralizar al medio ácido mediante la formación de NH_4^+ y generar un ambiente apto para su supervivencia [31,32]. Diversos estudios han evidenciado que el tratamiento con omeprazol u otros inhibidores de la bomba de protones, en conjunto con el uso de dos antibióticos, mejora la eficacia de éstos para combatir la infección [33]. Se ha sugerido que dicho resultado puede deberse a un mejor efecto de amoxicilina en un pH gástrico cercano a 7, así como también a que el omeprazol inhibe a la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*, demostrado en estudios *in vitro* [34,35].

3.1.7 Usos no convencionales del omeprazol

El omeprazol ha sido objeto de estudio en el tratamiento de la giardiasis humana, junto al rabeprazol (también inhibidor de la bomba de protones) y a otros fármacos desarrollados con fines no giardicidas (sulbutiamina y aurotiomalato). La giardiasis es una patología que afecta al sistema digestivo y es causada por *Giardia lamblia*, un protista carente del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa como mecanismos de obtención de energía, aunque tiene las enzimas necesarias para realizar glucólisis fermentativa y la vía de la arginina dihidrolasa [36]. La vía de la arginina dihidrolasa es una vía de obtención de energía en la que participan las enzimas arginina deiminasa, ornitina transcarbamoilasa y carbamato quinasa, que se esquematiza en la Figura 9 [37].

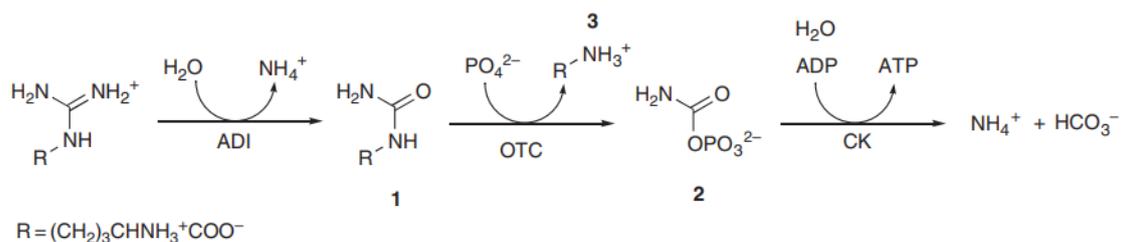


Figura 9. Vía de la arginina dihidrolasa. Es una vía de obtención de energía en la que participan tres enzimas. La primera de ellas es la arginina deiminasa, que cataliza la conversión de L-arginina a citrulina (1) y amonio. A partir de citrulina, la enzima ornitina transcarbamoilasa cataliza la formación de carbamoilfosfato (2) y ornitina (3). La otra enzima involucrada es la carbamato quinasa, que utiliza carbamoil fosfato para fosforilar ADP, produciendo ATP, amoníaco y bicarbonato o CO_2 . Figura tomada de [37].

La enzima giardial arginina deiminasa (GIADI) que participa en esta vía no está presente en humanos, sin embargo, sí existen en humanos enzimas denominadas peptidil arginina deiminasas (PAD), que son dependientes de Ca^{2+} y catalizan la citrulinación o deiminación, una

modificación postraduccional en proteínas en la que los residuos de arginina se modifican a citrulina [38]. Existe una isoforma de dicha enzima (PAD4) que cumple un importante rol en la deiminación de histonas, regulando la transcripción del ADN a nivel de la cromatina [39].

Considerando que el omeprazol y el rabeprazol son capaces de reaccionar con tioles y dado que la estructura de GIADI se encuentra enriquecida en residuos de cisteína, se evaluó el efecto de dichos fármacos sobre esta enzima, observándose una alteración en la estructura y disminución de su actividad. Mediante el uso de omeprazol y rabeprazol, se logró una inhibición eficiente de GIADI que afectó la viabilidad de los trofozoítos. También se observó que el enquistamiento (forma infectante y de resistencia ante condiciones de estrés ambiental) de los trofozoítos se vio afectado ante el uso de rabeprazol, esto podría atribuirse al rol del amoníaco en la síntesis de la pared de polisacáridos de los mismos y la disminución de su concentración al verse afectada la actividad de GIADI, demostrando el potencial de dicho fármaco para su uso como giardicida. Sin embargo, el efecto del omeprazol en la formación de quistes no fue evaluado [36].

3.2 Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un compuesto tóxico para numerosos organismos, especialmente a altas concentraciones. Sin embargo, debido a que a bajas concentraciones desempeña un rol como molécula señalizadora en procesos biológicos y de citoprotección, recientemente ha crecido el interés en su estudio. A su vez, diversos trabajos sugieren un rol protector frente a diversas patologías, principalmente en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, ya que se ha encontrado relación entre estas y alteraciones en el metabolismo de H_2S [40,41].

3.2.1 Propiedades fisicoquímicas del H_2S

El H_2S es una molécula pequeña análoga a la molécula de agua. Se diferencia de ésta por su ángulo de enlace (92°), su poca polaridad y su incapacidad de formar enlaces de hidrógeno, debido a que el azufre posee un electronegatividad menor a la del oxígeno. A $25^\circ C$ y 1 atm, el H_2S presenta una solubilidad en agua de 102.8 mM y se encuentra en estado gaseoso, por lo que su manipulación implica tomar ciertas precauciones, como el uso de viales tapados [42,43]. El H_2S es un ácido débil diprótico, con valores de pK_a de 6.98 (**Ec. 1**) y mayor a 17 (**Ec. 2**) [44]. Por lo tanto, a un pH de 7.4, el 72 % se encuentra en forma de HS^- y el 28 % en forma de H_2S , mientras que la concentración de S^{2-} es despreciable [43]. En este texto, H_2S hace referencia a la mezcla de H_2S y HS^- en solución, a menos que se especifique lo contrario.



El H_2S presenta un coeficiente de permeabilidad a membranas de 3 cm s^{-1} , el cual fue estimado a partir del coeficiente de difusión de H_2S en membranas, el coeficiente de partición K_p y el ancho de la bicapa lipídica. Esto indica una baja resistencia de las membranas a la permeabilidad intercelular, consistente con el rol de señalización que cumple la molécula [45].

3.2.2 Reactividad del H_2S

En el H_2S el azufre presenta un estado de oxidación -2, y es la forma más reducida en la que puede encontrarse. Sin embargo, el azufre puede oxidarse adoptando estados de oxidación desde -1 a +6 formando compuestos como sulfito (SO_3^{2-}), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulfato (SO_4^{2-}), polisulfuros inorgánicos (HS_n^- , $n \geq 1$), azufre elemental (S_8), persulfuros (RSS^-/RSSH) y polisulfuros de alquilo (RSS_nSR y RSS_n^-) [43].

El H_2S , específicamente el HS^- , es capaz de reaccionar con electrófilos en reacciones de sustitución o adición, mediante mecanismos similares a los tiolatos (RS^-), para formar un nuevo nucleófilo que puede volver a reaccionar con un electrófilo. A modo de ejemplo, la reacción de HS^- con un agente alquilante (R^+) tendrá como producto un tiol (**Ec. 3**), el cual es también un nucleófilo y podrá reaccionar con otro electrófilo (**Ec. 4**) [43]. Sin embargo, el HS^- presenta una reactividad menor a la de los tiolatos [46].



El HS^- no puede reaccionar con tioles debido a que ambos presentan el estado de oxidación más reducido, pero puede reaccionar con productos de oxidación de tioles, como disulfuros, ácidos sulfénicos y trisulfuros [46]. La reacción de HS^- con disulfuros es reversible, ocurre mediante un mecanismo $\text{S}_\text{N}2$ y da lugar a la formación de persulfuros y tiolatos (**Ec. 5**). Por otro lado, su

reacción con ácidos sulfénicos produce persulfuros e hidroxilo (HO^\cdot , **Ec. 6**) [46]. En la reacción de HS^- con trisulfuros (RSSSR) se forman dos persulfuros (Ec. 7), uno de ellos actuando como grupo saliente [43]. Esta reacción posee relevancia biológica debido a que tiene lugar en el ciclo catalítico de la enzima humana sulfuro quinona óxidorreductasa, que está presente en la mitocondria y cataliza la oxidación de H_2S acoplada a la reducción de la coenzima Q. En el primer paso del ciclo catalítico, el HS^- ataca nucleofílicamente a un trisulfuro de la enzima formado por dos residuos de cisteína para formar un persulfuro en cada cisteína [47].



El H_2S también es capaz de reaccionar con centros metálicos presentes en proteínas. Un ejemplo de esto es su interacción con el complejo hemo $[\text{Fe}^{\text{III}}]$ de las hemoproteínas férricas, donde se reduce hemo obteniendo hemo $[\text{Fe}^{\text{II}}]\text{-SH}^\cdot$ [43]. Si bien se conoce que tanto la forma neutra (H_2S) como la ionizada (HS^-) son capaces de unirse al hemo férrico, el entorno proteico dificulta el acceso de HS^- al mismo [48]. Por otro lado, el H_2S es capaz de reducir al grupo oxiferril $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ para formar el grupo sulfhemo, como ocurre en las mieloperoxidasas, causando la inhibición de la actividad de dicha enzima [43]. Sin embargo, no se ha reportado evidencia de unión de H_2S a hemoproteínas en estado ferroso, en cambio, ocurre la interacción con Fe^{2+} presente en compuestos inorgánicos [43,49]. Adicionalmente, el H_2S interacciona con proteínas que contienen Zn^{2+} , lo que presenta relevancia biológica ya que puede interferir en la función de factores de transcripción y enzimas que presentan dedos de zinc en su estructura [43]. Además, el H_2S actúa como reductor de hemo y de centros metálicos de cobre (Cu_A y Cu_B) presentes en la enzima citocromo c oxidasa, y forma complejos con los mismos, provocando la inhibición de la respiración celular [43,50].

3.2.3 Producción endógena de H_2S

La conversión de sulfato y sulfito a H_2S es llevada a cabo por microorganismos anaerobios y generalmente se encuentra acoplada a la oxidación de H_2 o compuestos orgánicos. Este proceso cumple un rol importante en los ciclos biogeoquímicos del azufre y del carbono [51,52].

Existen microorganismos capaces de reducir sulfato, azufre elemental, tiosulfato, entre otros, produciendo H₂S como producto de desecho, en un proceso denominado vía disimilativa de sulfato que permite obtener energía (Figura 10). El sulfato es utilizado como aceptor de electrones en la respiración anaerobia. Inicialmente, el sulfato participa junto al ATP en la formación de adenosina 5'-fosfosulfato (APS), catalizada por la enzima sulfato adenilil transferasa. APS actúa como aceptor de la cadena de transporte de electrones a través de la enzima APS reductasa citosólica, para dar sulfito y AMP. Posteriormente, el sulfito es reducido a H₂S mediante sulfito reductasas [43,52].

Por otro lado, las plantas y bacterias reducen pequeñas cantidades de sulfato mediante un proceso que se conoce como vía asimilativa de sulfato, necesaria para la síntesis de aminoácidos azufrados (Figura 10). Al igual que la vía disimilatoria de sulfato, requiere de la formación de APS mediante sulfato y ATP. En plantas, el APS es reducido por la enzima APS reductasa, utilizando electrones provenientes del glutatión para formar sulfito, el cual es reducido a H₂S mediante la enzima sulfito reductasa, a expensas de NADPH. Por otro lado, en bacterias ocurre la formación de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) a partir de APS, siendo este el paso característico de esta vía. El PAPS puede ser reducido posteriormente por NADH para formar sulfito, el cual puede reducirse a H₂S mediante NADPH [43,53].

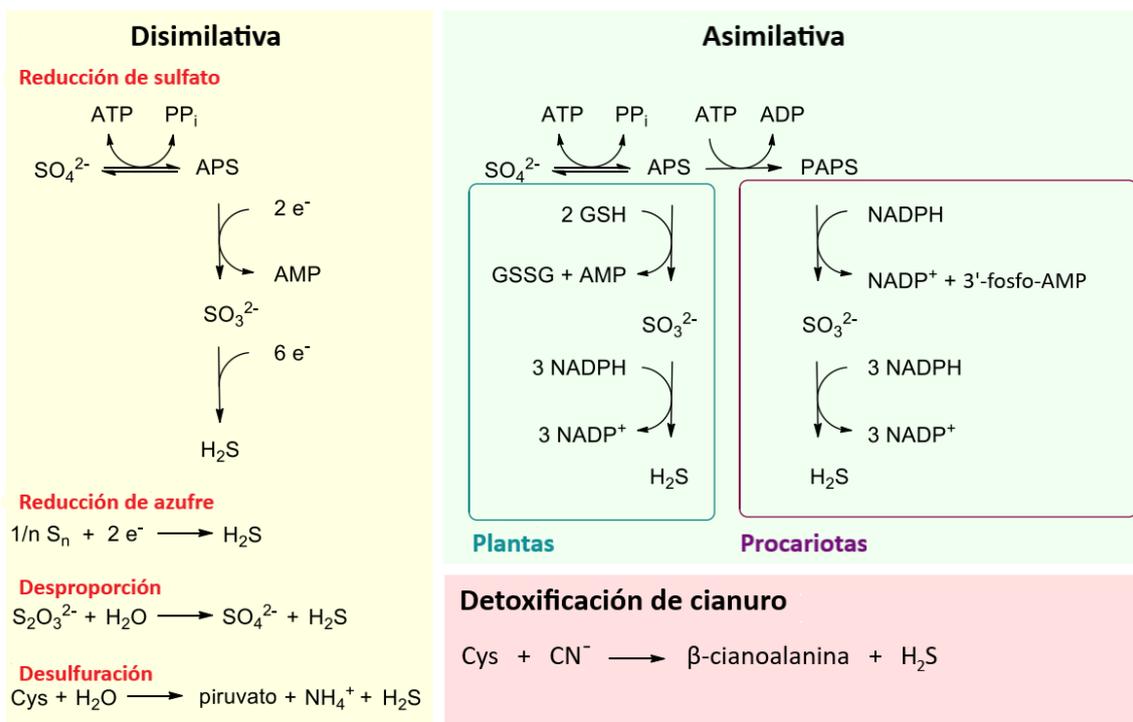


Figura 10. Vías de formación de H₂S. Se esquematizan las vías disimilativa y asimilativa de reducción de sulfato a H₂S, así como también la vía de detoxificación de cianuro. Figura adaptada de [43].

La producción de H₂S en sistemas biológicos ocurre además mediante la reducción de azufre elemental (en bacterias y arqueas), por desproporción (a partir de la transferencia de electrones entre diferentes sustratos como el tiosulfato, para formar sulfato y H₂S), mediante desulfuración de cisteína (liberación de formas reducidas del azufre presentes en residuos de cisteína) y detoxificación de cianuro (presente en plantas, algunas bacterias, insectos y nemátodos) (Figura 10) [43,54]. Por ejemplo, en *C. elegans* la vía de detoxificación de cianuro constituye un mecanismo de desintoxicación de amigdalina, un glucósido cianogénico presente en semillas de manzana, durazno y cerezas [54].

En mamíferos, debido a su incapacidad de reducir sulfato u otros compuestos inorgánicos, el azufre es incorporado en la dieta en su forma reducida, a partir de los aminoácidos cisteína y metionina. El H₂S es sintetizado a partir de aminoácidos azufrados mediante tres enzimas, la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST), cistationina β-sintasa (CBS) y cistationina γ-liasa (CSE) (Figura 11) [43].

La enzima CBS puede catalizar la reacción de condensación de L-cisteína y L-homocisteína, dependiente de piridoxal 5'-fosfato para formar L-cistationina y H₂S. A su vez, dicha enzima puede catalizar la condensación de dos residuos de cisteína, para formar lantionina y H₂S, así como también cataliza la reacción de sustitución en β de cisteína por H₂O, para formar serina y H₂S. La reacción canónica de dicha enzima involucra la condensación de L-serina y L-homocisteína, para producir L-cistationina y agua [43].

La enzima CSE, además de producir H₂S a expensas de cisteína, es capaz de catalizar la reacción de α,γ-eliminación de homocisteína para formar α-cetobutirato, NH₄⁺ y H₂S. Además, cataliza la sustitución en γ de homocisteína por otra molécula del mismo aminoácido, para producir homolantionina y H₂S. Esto se debe a que la CSE puede utilizar homocisteína como primer sustrato, además de cisteína. La reacción canónica de esta enzima consiste en la formación de cisteína, α-cetobutirato y NH₄⁺, a partir de cistationina [43].

La enzima MST cataliza la formación de H₂S a partir de 3-mercaptopiruvato en dos pasos. En el primer paso, el átomo de azufre del 3-mercaptopiruvato es transferido hacia la cisteína del sitio activo de la enzima, formando piruvato y persulfuro de cisteína. En el segundo paso de la reacción, el azufre externo del persulfuro de cisteína formado en el sitio activo de MST, se transfiere a un tiol, a partir del cual se formará un nuevo persulfuro, del cual podrá producirse H₂S [43]. Corresponde mencionar que el 3-mercaptopiruvato se forma a partir de la transaminación de cisteína, mediante la enzima cisteína aminotransferasa [43,55].

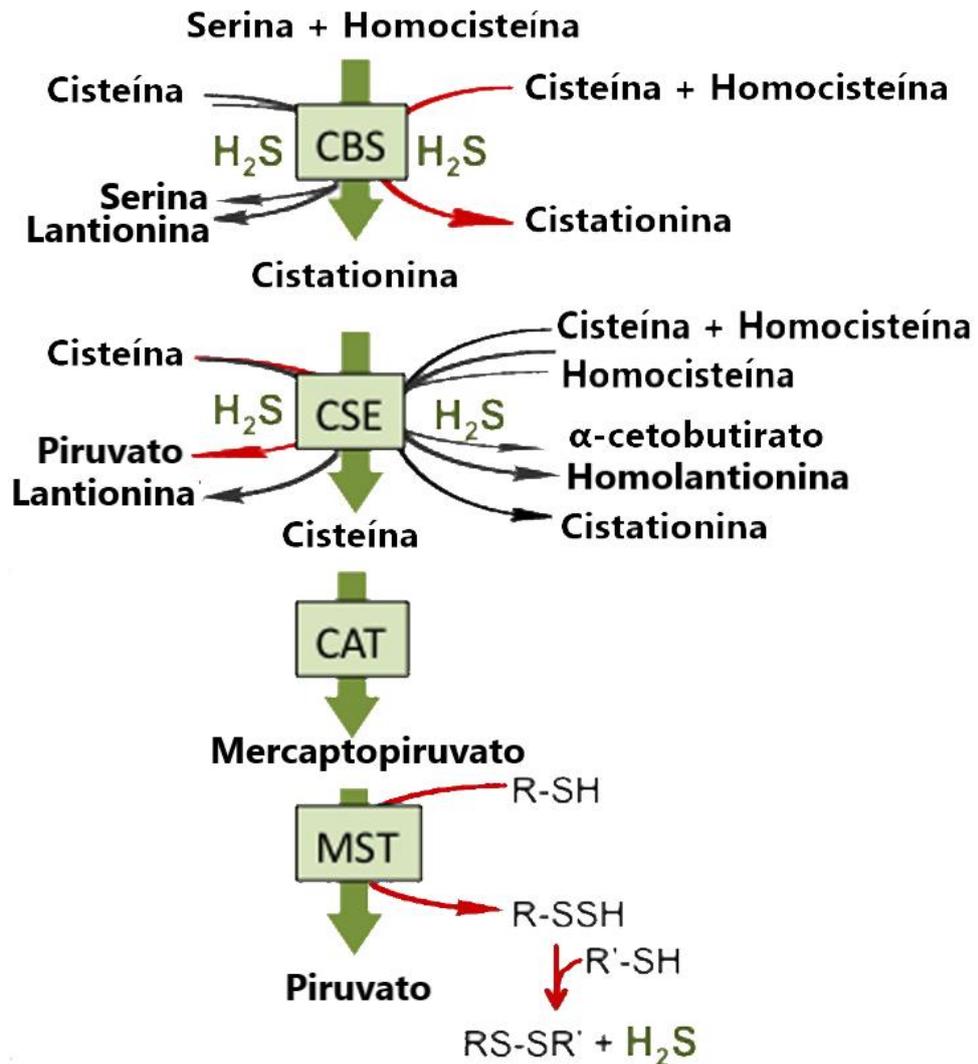


Figura 11. Vías de síntesis de H_2S en mamíferos. Las vías detalladas en esta figura no corresponden a la vía mayoritaria del catabolismo de la cisteína en mamíferos. Se muestran las enzimas cistationina β -sintasa (CBS) y cistationina- γ -liasa (CSE), así como enzimas con actividad cisteína aminotransferasa (CAT) y 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST). En color rojo se representan las reacciones mayoritarias para la formación de H_2S para cada enzima. Figura adaptada de [55].

3.2.4 Catabolismo

La detoxificación de H_2S ocurre mediante su oxidación, siendo los productos finales tiosulfato y sulfato. Este proceso tiene lugar en la mitocondria y en humanos ocurre en la mayoría de los tejidos, principalmente en los epitelios respiratorio y gastrointestinal, debido a su exposición al H_2S de origen bacteriano. El H_2S es oxidado a glutatión persulfuro (a expensas de glutatión) o tiosulfato (a expensas de sulfito) mediante la enzima sulfuro quinona óxidorreductasa. Los electrones liberados en dicha oxidación se transfieren al complejo III de la cadena de transporte

de electrones, mediante la ubiquinona, contribuyendo a la producción de ATP. Posteriormente, el glutatión persulfuro es oxidado a sulfito por la enzima persulfuro dioxigenasa, y a su vez este último puede ser oxidado a sulfato mediante la enzima sulfito oxidasa, o puede convertirse en tiosulfato por la rodanasa, siendo ambos productos excretados por la orina [56].

El proceso de metilación del H₂S ocurre en el citoplasma celular y también contribuye a su eliminación. Mediante la enzima tiol S-metiltransferasa, el H₂S produce metanotiol y sulfuro de dimetilo [56].

Una vía de eliminación alternativa ocurre mediante la reacción con metaloproteínas, por ejemplo, con la metahemoglobina de los glóbulos rojos, para formar tiosulfato e hidropolisulfuros. Este mecanismo cumple un importante rol en estas células debido a la incapacidad de detoxificación de H₂S ante la ausencia de la vía canónica de oxidación mitocondrial [57].

3.2.5 Persulfuros

Los persulfuros también participan en el transporte y metabolismo del azufre. Son intermediarios en la oxidación mitocondrial de H₂S y en la síntesis de centros ferrosulfurados. Además, se ha propuesto que podrían participar en los procesos de señalización de H₂S [43].

Su formación puede ocurrir mediante vías que dependen directamente de H₂S, por ejemplo, en las reacciones con derivados oxidados de tioles como disulfuros, ácidos sulfénicos y trisulfuros (RSSSR) (Ecs. 5-7). A su vez, el H₂S puede participar de forma indirecta en la formación de persulfuros mediante la reacción de productos de oxidación (tiosulfato y polisulfuros) con tiolatos. Por otro lado, existen vías de formación de persulfuros independientes de H₂S que son catalizadas por las enzimas CBS, CSE, cisteína desulfurasa y MST. La síntesis a través de las enzimas cisteína desulfurasa y MST, ocurre a partir de cisteína y 3-mercaptopiruvato, respectivamente. Por otro lado, CBS cataliza la formación de persulfuros a partir de cistina y CSE a partir de cistina u homocistina [43]. Sin embargo, debido a la baja concentración de cistina y homocistina en el citosol, las reacciones catalizadas por CBS y CSE no parecen contribuir significativamente a la síntesis de persulfuros *in vivo* [58].

Los persulfuros son especies ácidas y en solución acuosa se encuentra la forma protonada (RSSH) en equilibrio con la forma aniónica (RSS⁻). Su enlace SH es más débil que el de los tioles de los que derivan, lo cual los vuelve más ácidos (presentan valores de pK_a más bajos que los tioles) [59]. Por otro lado, conservan la capacidad de los tioles de actuar como nucleófilos. Por ejemplo,

su forma ionizada (RSS^-) puede reaccionar con electrófilos como los disulfuros para formar trisulfuro y tiolato (Figura 12) [59]. A diferencia del H_2S y los tioles, los persulfuros también presentan un carácter electrofílico (Figura 12) [43,46]. Ambos átomos de azufre pueden actuar como centros electrofílicos. Cuando el azufre externo es atacado por un nucleófilo se produce un tiolato (RS^-). A su vez, cuando el nucleófilo es un tiolato, ocurre una reacción denominada transpersulfuración, y se forma un nuevo persulfuro a nivel del tiolato. Por otro lado, el ataque nucleofílico al azufre interno de los persulfuros forma H_2S . Cuando el nucleófilo es un tiolato, también se forma un persulfuro [43].

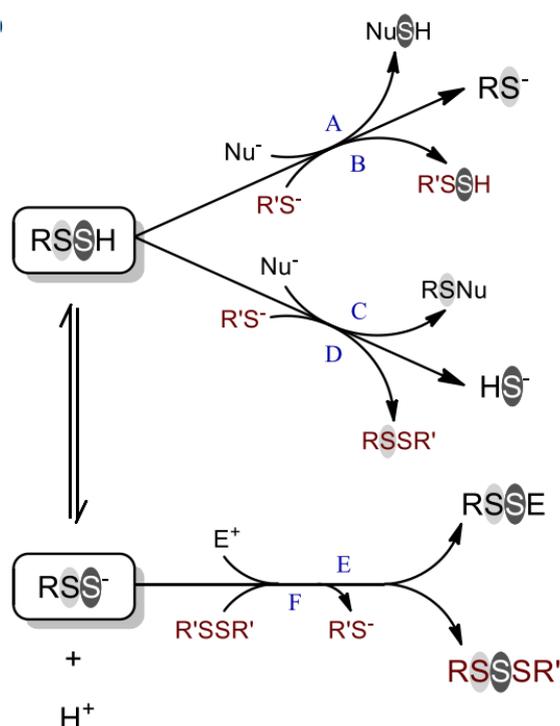


Figura 12. Reactividad de los persulfuros. Se esquematizan las reacciones de los persulfuros en su forma protonada (RSSH) con nucleófilos (reacciones A-D) y en su forma ionizada (RSS^-) con electrófilos (reacciones E-F). Figura tomada de [43].

3.2.6 Roles biológicos del H_2S y de los persulfuros

Como se explicó previamente, el H_2S es oxidado en la mitocondria para formar compuestos de menor toxicidad como el tiosulfato y el sulfato. Al H_2S se le ha adjudicado un rol de mediador de funciones fisiológicas. Sin embargo, a altas concentraciones es considerado tóxico, ya que puede inhibir a la enzima citocromo c oxidasa (o complejo IV) de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria [50,60].

El H_2S tiene la capacidad de reaccionar con especies reactivas del oxígeno y especies reactivas

del nitrógeno. Sin embargo, a pesar de que su capacidad de difundir a través de membranas le confiere una ventaja frente a antioxidantes clásicos como el glutatión, su concentración fisiológica es mucho menor, por esta razón no es esperable que actúe como antioxidante *in vivo*, a través del atrapamiento directo de especies oxidantes [56,61].

Una de las maneras en que el H₂S es capaz de ejercer efectos fisiológicos es como precursor de polisulfuros de hidrógeno (HS_nS⁻, n ≥ 1), los cuales están implicados en la regulación de canales iónicos, supresores de tumores y proteínas quinasas [62,63]. Los polisulfuros además tienen la capacidad de persulfurar proteínas en sus cisteínas mediante una modificación postraducciona denominada persulfuración [63]. Adicionalmente, la persulfuración puede ocurrir a partir de reacciones del H₂S, aunque no por una reacción directa con los tioles, sino que por la reacción con productos oxidados de los tioles como ácidos sulfénicos o disulfuros (Ec 5 y 6) [56,64]. La persulfuración de cisteínas proteicas críticas puede modificar su función. Por ejemplo, el transporte de H₂O₂ por acuaporina-8 es modulado por la persulfuración de la cisteína 53. Cabe destacar que la cisteína debe ser previamente oxidada a ácido sulfénico o disulfuro para poder reaccionar con el H₂S [65].

A la persulfuración se le ha atribuido un rol en ciertas patologías. A modo de ejemplo, se ha estudiado la relación entre los niveles de H₂S y las enfermedades neurodegenerativas. Se ha encontrado que en la enfermedad de Alzheimer, la formación de fibras β-amiloides podría afectar la producción de H₂S y glutatión a partir de cisteína por las enzimas CBS y CSE, mediante la inhibición del transportador neuronal de cisteína, lo cual se relacionaría con el aumento del estrés oxidativo y la neurodegeneración, pero no se encontraron estudios que relacionen este hecho con la persulfuración [66]. En cambio, se ha demostrado el rol de la persulfuración en la enfermedad de Parkinson, asociado al mal plegamiento de la proteína α-sinucleína. Dichas proteínas mal plegadas son eliminadas por la enzima parkina, encontrándose correlación entre la disminución de la persulfuración de parkina y la disminución de la eliminación de las proteínas mencionadas [55,67,68].

3.2.7 El H₂S y el estómago

Se ha propuesto que el H₂S participa en la inhibición de la secreción de ácido en las células parietales. Como se mencionó previamente, el H₂S podría ser producido por las enzimas CBS y CSE, ya que se expresan en la mucosa gástrica sana. Se ha demostrado que tanto la expresión de dichas enzimas como la síntesis de H₂S aumenta en la úlcera gástrica, desempeñando un rol

protector de la mucosa. También se demostró que este efecto protector del H₂S es independiente de la síntesis de NO*, sugiriendo que podría deberse a las propiedades vasodilatadoras del H₂S [11,69]. La vasodilatación mediada por H₂S puede ocurrir mediante el mecanismo apertura de canales de K⁺ y bloqueo de canales de Ca²⁺, así como también es capaz de inhibir la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos al endotelio, provocando un aumento del flujo sanguíneo hacia la mucosa gástrica y por lo tanto un mayor suministro de oxígeno [70,71].

Por otro lado, también se ha demostrado un rol protector del H₂S asociado a un efecto inhibitorio de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α , secretada por los macrófagos en la úlcera gástrica. Por esta razón, el H₂S podría asociarse a la disminución del edema [71]. Además, en trabajos previos se ha reportado que los macrófagos infectados por *Helicobacter pylori* presentan una mayor expresión de la enzima CSE, permitiéndole evadir la respuesta inmune del hospedador [72]. Por un lado, esto se debe a que CSE cataliza la síntesis de cistationina, necesaria para la supervivencia del patógeno en el macrófago cuando es fagocitado por el mismo. Por otro lado, dicha enzima provoca la desregulación del metabolismo de las poliaminas, contrarrestando la respuesta proinflamatoria de los macrófagos, así como también aumenta la metilación de histonas específicas, provocando el silenciamiento de genes proinflamatorios [72,73].

Como se mencionó previamente, una de las causas de la úlcera péptica es la infección por *Helicobacter pylori*. Dicho patógeno coloniza la mucosa gástrica, causando gastritis atrófica y aumentando el riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico. Estudios realizados evaluaron la producción endógena de H₂S en células de cáncer gástrico, la cual se veía incrementada por la coinoculación de *Helicobacter pylori* debido a un aumento en el metabolismo de la metionina, aminoácido a partir del cual se produce H₂S. Esto podría comprender un mecanismo de defensa celular [74]. Además, se ha encontrado una correlación entre pacientes infectados por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de halitosis, constatándose que dicho síntoma disminuye mediante el tratamiento de la infección con omeprazol y claritromicina [75]. La halitosis se relaciona con la presencia de compuestos volátiles de azufre como el H₂S y metil mercaptano, que pueden ser sintetizados por *Helicobacter pylori* a partir de metionina y/o cisteína [76].

3.3 Hipótesis

Considerando que la sulfenamida derivada del omeprazol reacciona con tioles para formar tioéteres [4,7], que el H_2S es capaz de reaccionar con ácidos sulfénicos para formar persulfuros [46,77] y que la reactividad de los ácidos sulfénicos es similar a la de las sulfenamidas [78,79], se hipotetiza que la sulfenamida derivada del omeprazol podría reaccionar con H_2S para generar un persulfuro y luego decaer a un disulfuro (Figura 13). De ser así, esta reacción podría servir como estrategia analítica para determinar la presencia de H_2S en muestras bioquímicas. A su vez, podría llegar a ocurrir en sistemas biológicos, especialmente en compartimientos ácidos expuestos a H_2S , como es el caso de los lisosomas.

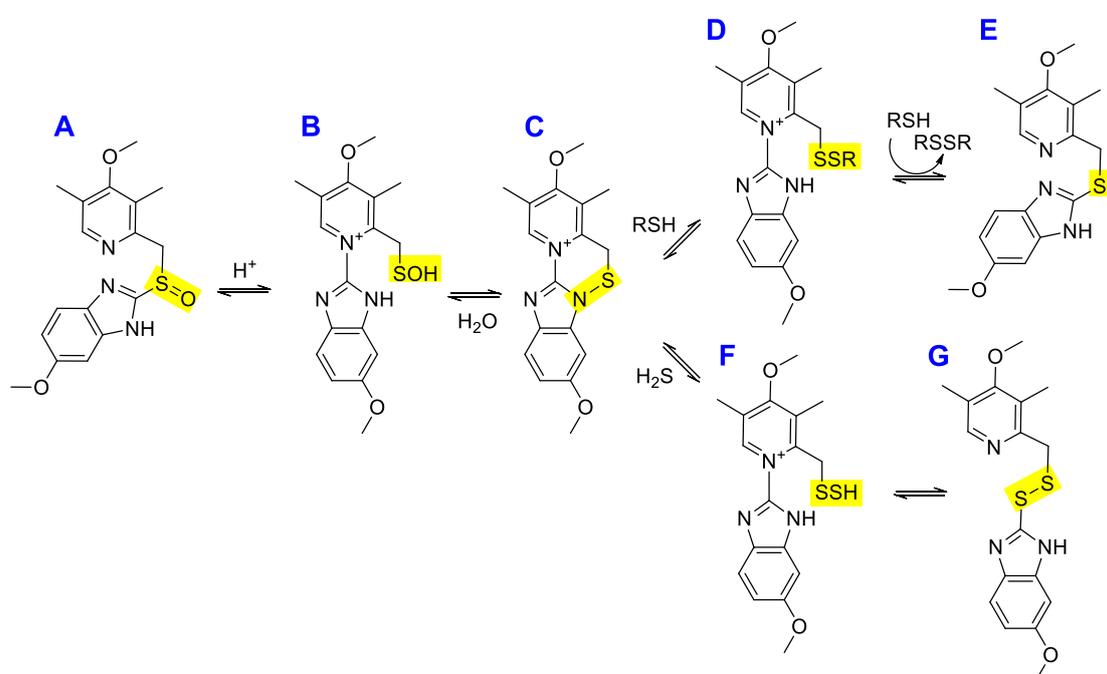


Figura 13. Reacción de omeprazol con tioles e hipótesis de reacción de omeprazol con H_2S . En medio ácido, el sulfóxido del omeprazol (A) forma un ácido sulfénico (B) en equilibrio con una sulfenamida (C). En presencia de tioles, la sulfenamida forma un disulfuro mixto (D), el cual reacciona nuevamente con tioles para formar un tioéter (E). Se hipotetiza que en presencia de H_2S la sulfenamida forma un persulfuro (F), el cual decae a un disulfuro mixto (G), diferente al formado a partir de la reacción con tioles.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Avanzar en la comprensión de la química biológica del H₂S.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar si el omeprazol y el H₂S reaccionan. En tal caso, determinar los productos de reacción.

5 Materiales y métodos

5.1 Soluciones

Las soluciones concentradas de omeprazol (2.5 mM, mezcla racémica de los isómeros R y S, Sigma-Aldrich) y de 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol (2.5 mM, Sigma-Aldrich) se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO, AppliChem). Las soluciones de β -mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich) se prepararon en agua ultrapura. Las soluciones de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, 20 mM, AppliChem) se prepararon en etanol. Las soluciones de H₂S se prepararon en viales a partir de cristales de Na₂S·9H₂O (Carlo Erba) en los días de los experimentos; los cristales fueron lavados con agua destilada y posteriormente disueltos en agua ultrapura. Para manipular las soluciones de H₂S, se utilizaron jeringas *gas-tight* (Hamilton). Para preparar el Reactivo de Goldstein, se disolvió FeCl₃ (Sigma-Aldrich) (52 o 140 mM) en HNO₃ (Dorwil) (14.5 o 32.5 %, respectivamente). Los reductores ditiotreitól (DTT, AppliChem) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Sigma-Aldrich) se prepararon en agua destilada. A la solución *stock* de TCEP se le añadió NaOH concentrado (0.4 M) con el fin de obtener un pH alcalino. Las soluciones *stock* de tiocianato de potasio (KSCN, 40 mM, AppliChem) y cianuro de potasio (KCN, 0.5 M, Biopack) fueron preparadas en agua ultrapura.

5.2 Caracterización de reacciones por espectrofotometría UV-Vis

5.2.1 Reacciones de omeprazol con H₂S o BME a pH 4.5

La reacción de omeprazol (50 μ M) con H₂S (18-500 μ M) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5, Sigma-Aldrich) se evaluó a 25 °C por espectrofotometría UV-Vis (Varian Cary 60) en el rango de longitudes de onda de 240 a 500 nm, registrando espectros cada 1 min durante períodos de tiempo entre 24 y 72 min. Dichas reacciones se llevaron a cabo en una cubeta tapada con septo. Además, se siguió la variación de los espectros de absorbancia luego de adicionar TCEP (1 mM). Se realizaron controles con la concentración de DMSO presente en los experimentos para confirmar que no estuviera interfiriendo con los espectros de las especies de interés.

Análogamente, se estudió la reacción de omeprazol (50 μ M) con BME (50 o 500 μ M) y la descomposición de omeprazol solo (50 μ M) en el mismo amortiguador, a 25 °C. La concentración de cada solución de BME se determinó a partir de su reacción con un exceso de DTNB por la medida de la absorbancia del producto ($\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [80]). La reacción con BME en

exceso fue iniciada mediante el agregado de dicho reactivo, mientras que la reacción con concentraciones equimolares de omeprazol y BME fue iniciada con omeprazol para evitar su descomposición en citrato en ausencia de BME.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Origin 2017.

5.2.2 Estabilidad de la sulfenamida a pH 7.5

Se registraron espectros en el tiempo de la formación de la sulfenamida a partir de la reacción de omeprazol (50 μM) con HCl (0.1 o 87 mM). Alternativamente, se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) con HCl (71 mM); a los 6 min se tomaron alícuotas de 140 μL para ser diluidas con 1260 μL de agua o 1260 μL de amortiguador Tris (0.5 M, pH 7.5) y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo (Figura 14). Todos los experimentos fueron realizados a 25 °C. El HCl utilizado fue titulado previamente en bureta para determinar su concentración, se utilizó tris(hidroximetil)aminometano (0.1 M) como agente valorante y azul de bromocresol como indicador.

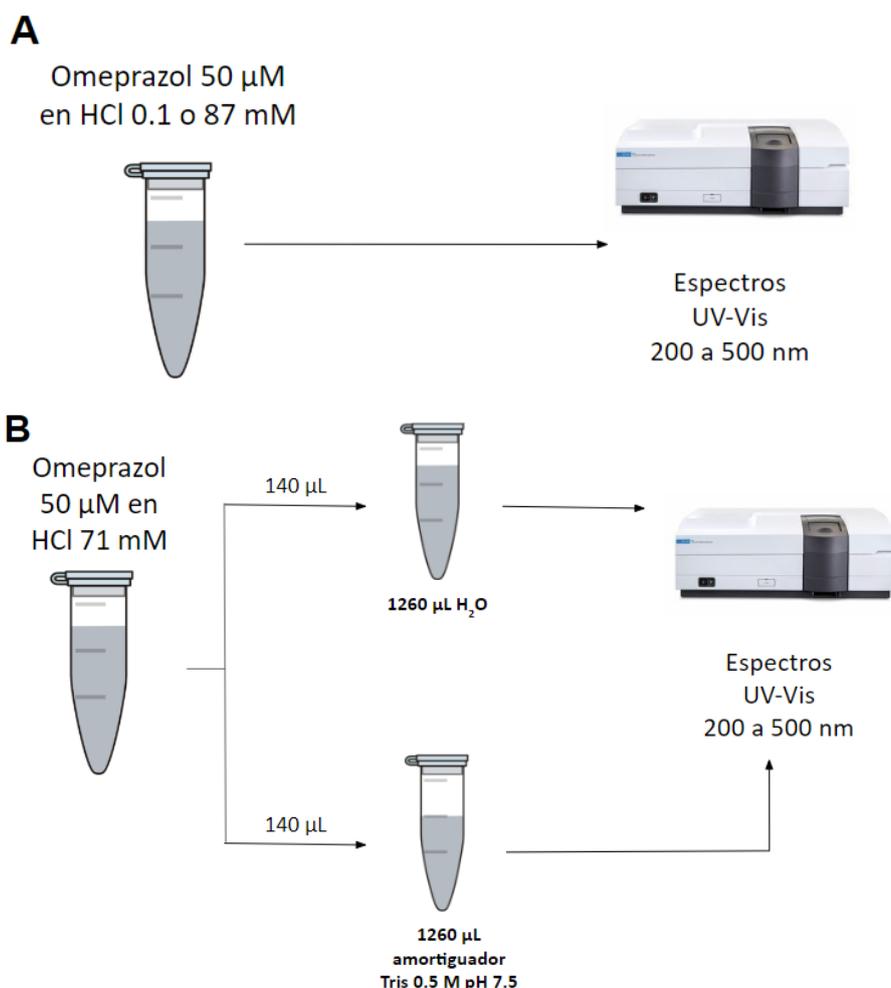


Figura 14. Evaluación de la formación de la sulfenamida del omeprazol y su estabilidad a pH cercano a la neutralidad. A) Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) en HCl 0.1 o 87 mM a 25 °C y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. **B)** Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) en HCl (71 mM) a 25 °C. A los 6 min se tomaron alícuotas de 140 μL que fueron diluidas con 1260 μL de agua ultrapura o amortiguador Tris (0.5 M, pH 7.5) y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo.

5.3 HPLC

Para analizar los productos de las reacciones de omeprazol, se realizaron experimentos de HPLC (Infinity, Agilent) utilizando una columna C18 de fase reversa (ZORBAX Eclipse Plus) y un detector de absorbancia UV-Vis de rearreglo de diodos. Se analizaron muestras conteniendo 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol (50 μM), omeprazol (50 μM) u omeprazol (50 μM) con H_2S (20, 50 o 200 μM), preincubadas en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5, 25 °C) durante 14 min, excepto las muestras de omeprazol solo y en presencia de H_2S 50 μM que fueron incubadas durante 7 y 35 min, respectivamente. Adicionalmente, las reacciones de omeprazol con H_2S fueron expuestas a TCEP (4 mM) durante 4 min. Todas las muestras se diluyeron al medio en acetonitrilo (30 %) con bicarbonato de amonio (100 mM). Se inyectaron 10 μL en el HPLC y se eluyeron con un

gradiente de bicarbonato de amonio (100 mM):acetonitrilo (100 %) (70:30 de 0 a 4 min, pasaje a 5:95 de 4 a 14 min, 5:95 de 14 a 16 min, retorno a 70:30 de 16 a 18 min, y 70:30 de 18 a 23 min) a un flujo de 0.8 mL min⁻¹. El procedimiento realizado es esquematizado en la Figura 15.

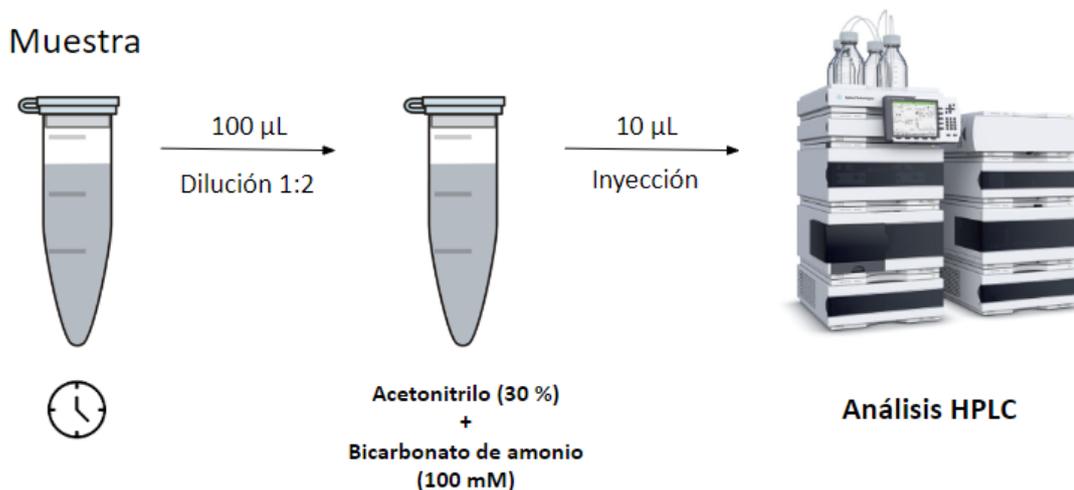


Figura 15. Preparación de muestras para el análisis mediante HPLC. Las muestras conteniendo 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol, omeprazol u omeprazol en presencia de H₂S (20–200 µM), preincubadas en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 °C, fueron diluidas al medio en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (100 mM). De dichas diluciones se tomaron alícuotas de 10 µL para su inyección en el equipo de HPLC.

5.4 Espectrometría de masas

Se analizaron muestras de omeprazol (50 µM) solo o en presencia de H₂S (9 o 50 µM) preincubado 5 min (excepto en presencia de H₂S 9 µM, preincubado 15 min), o BME (500 µM) preincubado 12 min, en un amortiguador con acetato de amonio (50 mM, pH 4.5) a 25 °C. Las muestras se diluyeron 1:50 en agua ultrapura y se analizaron por espectrometría de masas con un equipo QTRAP4500 (ABSciex), con fuente de ionización de *electrospray* (ESI) y analizador híbrido de triple cuadrupolo-trampa iónica lineal. Se realizó una infusión directa de las muestras al espectrómetro a un flujo de 5 µL min⁻¹, y el voltaje de la fuente y potencial de desagrupación se fijaron en 5,5 kV y 60 V, respectivamente. La identificación de iones moleculares se realizó mediante un espectro de masas empleando el primer cuadrupolo (Q1) en modo positivo a una velocidad de escaneo de 200 Da/s. Los experimentos de fragmentación fueron realizados empleando el modo *Product Ion* utilizando una energía de colisión de 30 V. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa Analyst 1.6.2 (ABSciex).

5.5 Cianólisis fría

Para evaluar la formación de compuestos con azufre sulfano, se realizó el método de cianólisis

fría a distintas reacciones (Figura 16). Se analizaron muestras de omeprazol (50 o 250 μM) preincubadas con H_2S (0.5 o 1 mM, respectivamente) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) durante 40 min a 25 °C. Se realizaron controles con omeprazol o H_2S solos y se analizó la reacción de omeprazol (250 μM) con BME (1 mM) en las mismas condiciones. Adicionalmente, se realizaron pruebas con un amortiguador de acetato de amonio (0.1 M, pH 4.5).

Las reacciones fueron detenidas por el agregado de KCN (50 mM, concentración final) y NH_4OH (0.75 % v/v , concentración final) (Sigma-Aldrich). Luego de 45 min a temperatura ambiente, se tomó una alícuota de 820 μL de cada muestra para ser mezclada con 20 μL de formaldehído (38 % v/v) y 200 μL de Reactivo de Goldstein (FeCl_3 27 mM en HNO_3 6.3 % o FeCl_3 10 mM en HNO_3 2.8 %, concentraciones finales). Las mezclas fueron analizadas por absorbancia UV-Vis entre 400 y 600 nm. Las absorbancias a 460 nm fueron intrapoladas en curvas de calibración de SCN^- (0-129 μM) realizadas con estándares de KSCN preparados los días de los experimentos y sometidos al mismo tratamiento que las muestras.

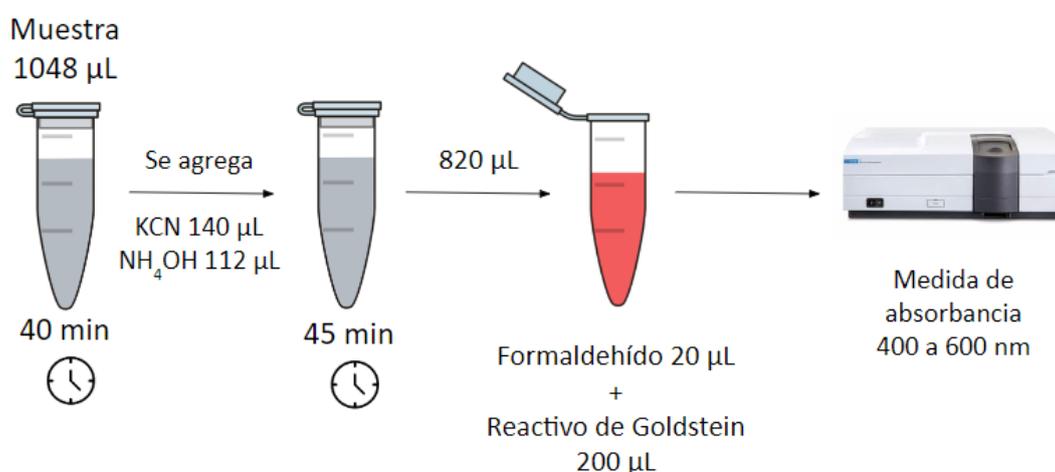


Figura 16. Método de cianólisis fría. Se puso a reaccionar omeprazol, H_2S , omeprazol con H_2S u omeprazol con BME, en citrato (0.1 M, pH 4.5) o acetato de amonio (50 mM, pH 4.5), a 25 °C y se incubó durante 40 min. A dichas muestras se les agregó KCN (140 μL , 500 mM) y NH_4OH (112 μL , 9.3 % v/v) y se incubó durante 45 min. Se diluyeron alícuotas de dichas muestras en formaldehído (20 μL , 38 % v/v) y Reactivo de Goldstein (200 μL) en una concentración final de FeCl_3 27 mM y HNO_3 6.3 % o FeCl_3 10 mM y HNO_3 2.8 %. Luego se registraron espectros UV-Vis en el rango de 400 a 600 nm.

6 Resultados y discusión

6.1 Cinética de la reacción de omeprazol y H₂S

6.1.1 Espectro de absorbancia UV-Vis de omeprazol en agua

Con el objetivo de conocer las características del espectro del omeprazol se registraron espectros UV-Vis de una solución de omeprazol (50 μ M) en agua, luego de 2 o 13 min de incubación. En dichos espectros se observó un máximo de absorbancia a 301 nm y un máximo relativo a 274 nm (Figura 17), al igual que en los espectros reportados para el omeprazol en trabajos previos [10]. El espectro no varió con el tiempo, concluyendo que el omeprazol no se descompone al pH del agua equilibrada en aire.

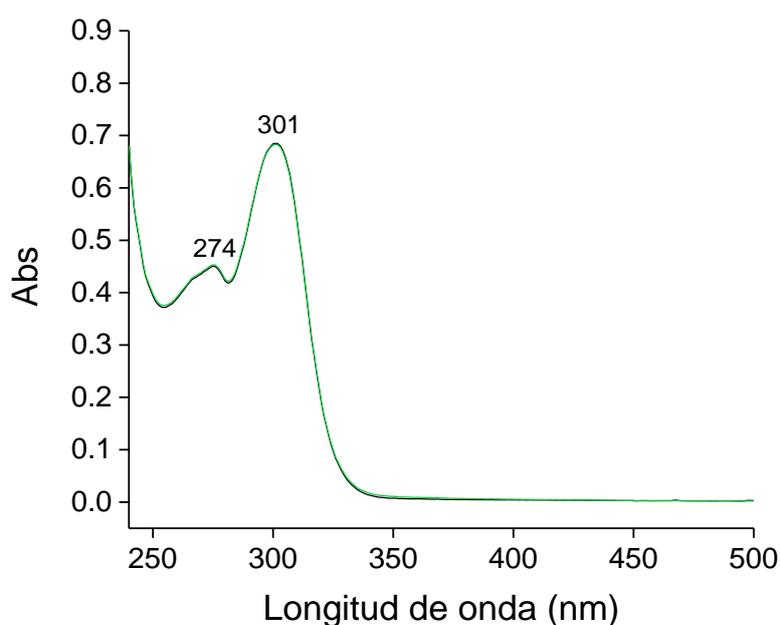


Figura 17. Espectro UV-Vis de omeprazol en agua. Espectro de omeprazol (50 μ M) en agua a 25 °C, registrado luego de 2 (línea negra) o 13 min (línea verde) de incubación; presentó un máximo de absorbancia a 301 nm y un máximo relativo a 274 nm.

Se determinó un coeficiente de extinción molar de $13682 \pm 14 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (promedio \pm desvío estándar) para el omeprazol en agua usando 14 valores de absorbancia a 301 nm (registrados cada 1 min, durante los primeros 13 min de incubación), las concentraciones determinadas por masa y la Ley de Lambert-Beer (Ec. 8), donde ϵ es la absorptividad molar, C la concentración y b

el camino óptico de 1 cm.

$$\text{Abs} = \epsilon C b$$

Ec. 8

6.1.2 Descomposición de omeprazol a pH ácido

Para evaluar la descomposición del omeprazol a pH ácido, se registraron espectros UV-Vis en el tiempo de omeprazol (50 μM) en amortiguador citrato (100 mM, pH 4.5) a 25 °C, durante 41 min (Figura 18A). El primer espectro registrado coincidió con el espectro correspondiente al omeprazol en agua. Luego de 41 min se observó un máximo a 287 nm y un aumento de absorbancia a 350 nm, lo cual se asoció a la formación de la sulfenamida [10]. Dada la ausencia de puntos isobésticos, se deduce que en estas condiciones los procesos de formación y decaimiento parcial de la sulfenamida ocurren en varios pasos. Se asociaron constantes exponenciales observadas (k_{obs}) de 0.58 ± 0.02 y $0.0676 \pm 0.0007 \text{ min}^{-1}$; determinadas por el ajuste de una función exponencial doble (Ec. 9) a los cursos temporales a 350 nm (Figura 18B). Esto es coherente con trabajos previos que muestran que la formación de sulfenamida a partir de omeprazol ocurre en varios pasos reversibles y que la descomposición del omeprazol en solución acuosa, a pH ácido y en ausencia de tioles, forma varios productos [4].

$$y = A_1 e^{-k_{\text{obs}_1} \cdot x} + A_2 e^{-k_{\text{obs}_2} \cdot x} + \text{constante}$$

Ec. 9

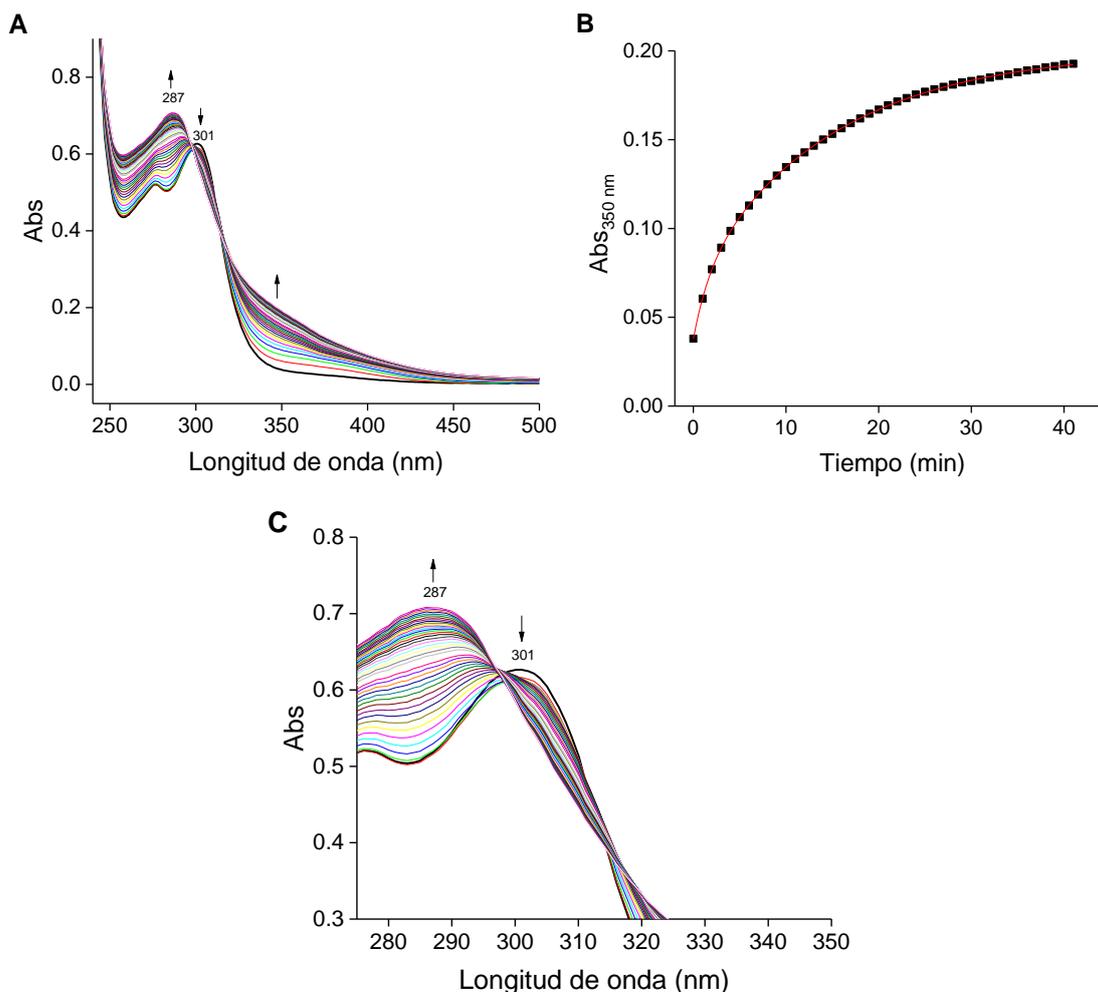


Figura 18. Descomposición del omeprazol a pH ácido. Se mezcló omeprazol (50 μM) con amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^{\circ}\text{C}$. **A)** Espectros UV-Vis en el tiempo registrados cada 1 min, durante 41 min. El espectro en negro representa el registrado inmediatamente luego de incubar. Presentaron picos de absorbancia a 287 y 301 nm. **B)** Curso temporal a 350 nm. El trazo en rojo representa el ajuste de una función exponencial doble con constantes exponenciales observadas (k_{obs}) de 0.58 ± 0.02 y $0.0676 \pm 0.0007 \text{ min}^{-1}$ y valores absolutos de amplitudes (A) de 0.0333 ± 0.0007 y 0.1293 ± 0.0005 , respectivamente. Los valores corresponden a los parámetros \pm el error del ajuste. **C)** Fragmento del gráfico A. No se observa la presencia de puntos isobásticos.

6.1.3 Descomposición del omeprazol en presencia de BME

Se estudió la descomposición del omeprazol (50 μM) en presencia de BME en concentraciones de exceso estequiométrico (500 μM), en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) mediante espectrofotometría UV-Vis. Luego de culminado el registro al cabo de 38 min, se observó un máximo de absorbancia a 284 nm, puntos isobásticos a 295 y 315 nm, y un aumento de la absorbancia a 350 nm (Figura 19A). Estos resultados coinciden con trabajos previos donde se determinó el espectro UV-Vis de la reacción de omeprazol con BME [10]. Los puntos isobásticos indican que la reacción ocurre sin acumulación de intermediarios. Los cursos temporales a 284

y 350 nm (Figura 19B) tuvieron un comportamiento exponencial. Se ajustaron funciones exponenciales simples (Ec. 10) a los datos resultando en k_{obs} de 0.0455 ± 0.0003 y $0.0465 \pm 0.0002 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. La similitud entre las k_{obs} sugiere que la reacción ocurrió en un solo paso significativo del punto de vista cinético, de acuerdo con la presencia del punto isobéptico.

Asimismo, se registraron reacciones con concentraciones equimolares de omeprazol (50 μM) y BME (50 μM) (Figura 20A). En este caso no se detectó con claridad la presencia de puntos isobépticos, a diferencia de la reacción con exceso de BME. Se ajustaron funciones dobles exponenciales a los cursos temporales a 286 y 350 nm (Figura 20B), obteniéndose k_{obs} de 0.0503 ± 0.0002 y $0.0498 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$, respectivamente, para la fase más lenta.

Los valores de k_{obs} a ambas concentraciones de BME coincidieron entre sí y fueron ligeramente menores al valor de la constante de descomposición del omeprazol solo ($0.0676 \pm 0.0007 \text{ min}^{-1}$) (Figura 18), sugiriendo que el paso limitante de la reacción de omeprazol y BME es la formación de la sulfenamida.

$$y = A e^{-k_{obs} x} + \text{constante}$$

Ec. 10

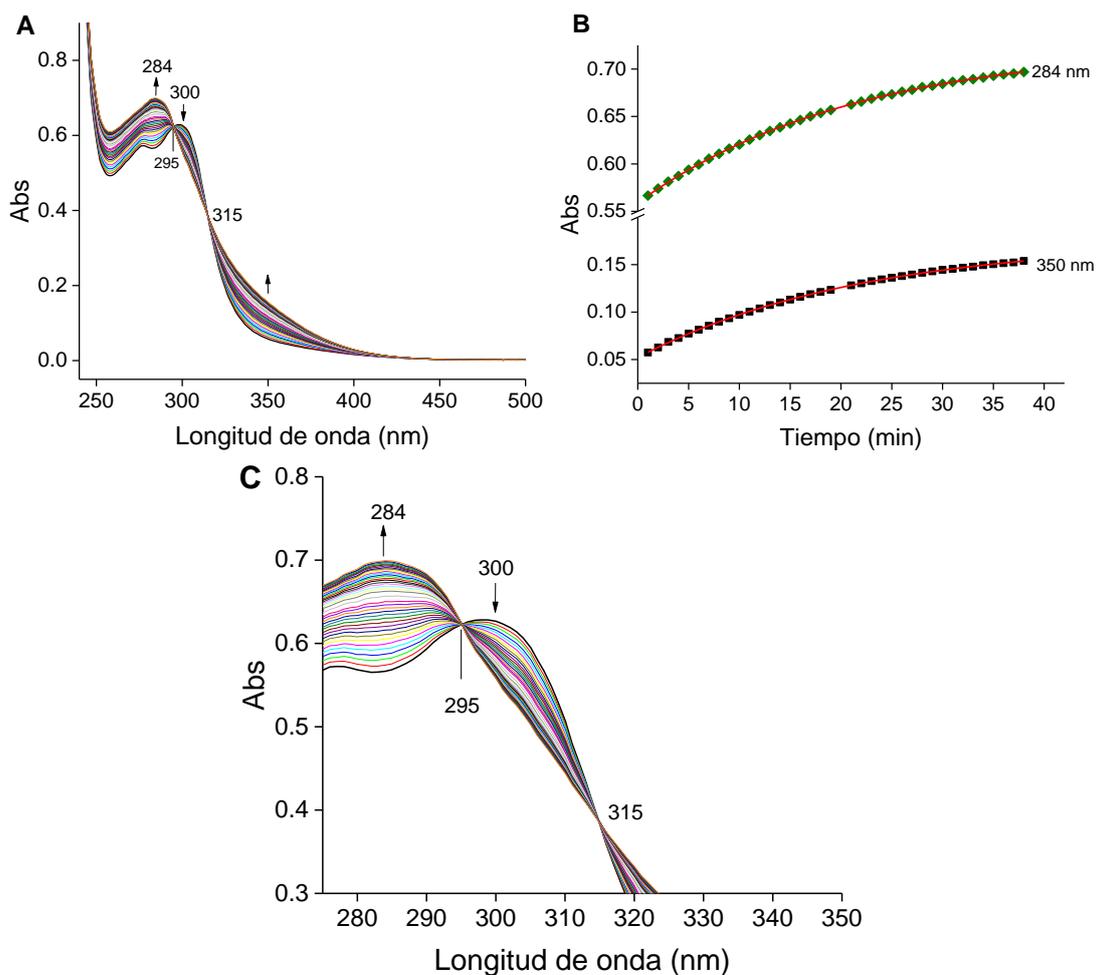


Figura 19. Reacción de omeprazol y BME en exceso. Se mezcló omeprazol 50 (μM) con BME (500 μM) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^{\circ}\text{C}$, y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. **A)** Espectros UV-Vis registrados cada 1 min, durante 38 min. **B)** Cursos temporales a 286 y 350 nm. A partir del ajuste de una función exponencial al curso temporal a 284 nm se obtuvo una k_{obs} de $0.0455 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$ y una amplitud de valor absoluto 0.1237 ± 0.0003 . Mediante el ajuste de una función exponencial al curso temporal a 350 nm se obtuvo una k_{obs} de $0.0465 \pm 0.0002 \text{ min}^{-1}$ y una amplitud de valor absoluto 0.1663 ± 0.0003 . Los valores corresponden a los parámetros \pm el error de los ajustes. **C)** Fragmento del gráfico **A**. Se observan puntos isosbéticos a 295 y 315 nm y picos de absorbancia a 284 y 300 nm.

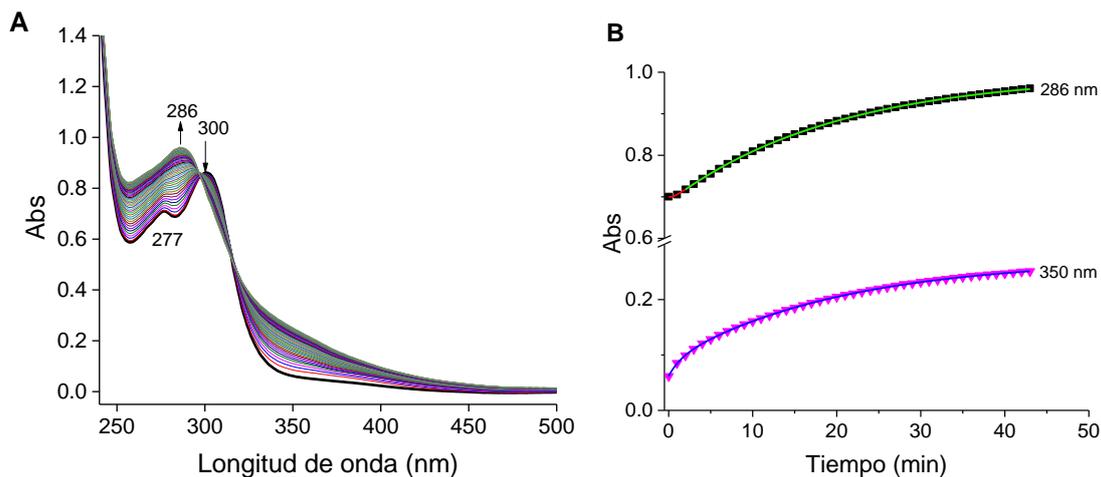


Figura 20. Reacción de omeprazol y BME en concentraciones equimolares. Se mezcló omeprazol 50 (μM) con BME (50 μM) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 °C y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. **A)** Espectros UV-Vis registrados cada 1 min, durante 57 min. Presentaron picos de absorbancia a 277, 286 y 300 nm. **B)** Cursos temporales a 286 y 350 nm. A partir del ajuste de una función doble exponencial al curso temporal a 286 nm se obtuvieron las constantes $k_{\text{obs}} = 1.6 \pm 0.3$ y $k_{\text{obs}} = 0.0503 \pm 0.0002 \text{ min}^{-1}$ con sus correspondientes amplitudes de valor absoluto 0.0124 ± 0.0007 y 0.3068 ± 0.0004 . Mediante el ajuste de una función doble exponencial al curso temporal a 350 nm se obtuvieron las constantes $k_{\text{obs}} = 0.72 \pm 0.03$ y $k_{\text{obs}} = 0.0498 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$ y amplitudes con valores absolutos de 0.0267 ± 0.0004 y 0.1843 ± 0.0003 . Los valores corresponden a los parámetros \pm el error del ajuste.

Dado que el disulfuro mixto resultante de la reacción de omeprazol con BME puede formar un tioéter en presencia de un reductor (Figura 13) [10], se agregó un exceso del reductor TCEP a la reacción de omeprazol con BME en concentraciones equimolares y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. Se observó una disminución de la absorbancia en todo el rango de longitudes de onda en relación al espectro obtenido en ausencia de reductor (Figura 21A), especialmente a 286 y 350 nm, lo cual se evidencia en los cursos temporales obtenidos a dichas longitudes de onda (Figura 21C). Corresponde mencionar que parte de la reacción con TCEP ocurrió en el tiempo de mezclado. Al culminar el registro a los 16 min, el máximo se ubicó a 297 nm. Se ajustó una función exponencial más recta (Ec. 11) al curso temporal a 292 nm (Figura 21B) y se obtuvo una constante de decaimiento de la mezcla de BME y omeprazol en presencia de TCEP (1 mM) de $0.80 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$.

$$y = A e^{-k_{\text{obs}} x} + \text{pendiente } x + \text{constante} \quad \text{Ec. 11}$$

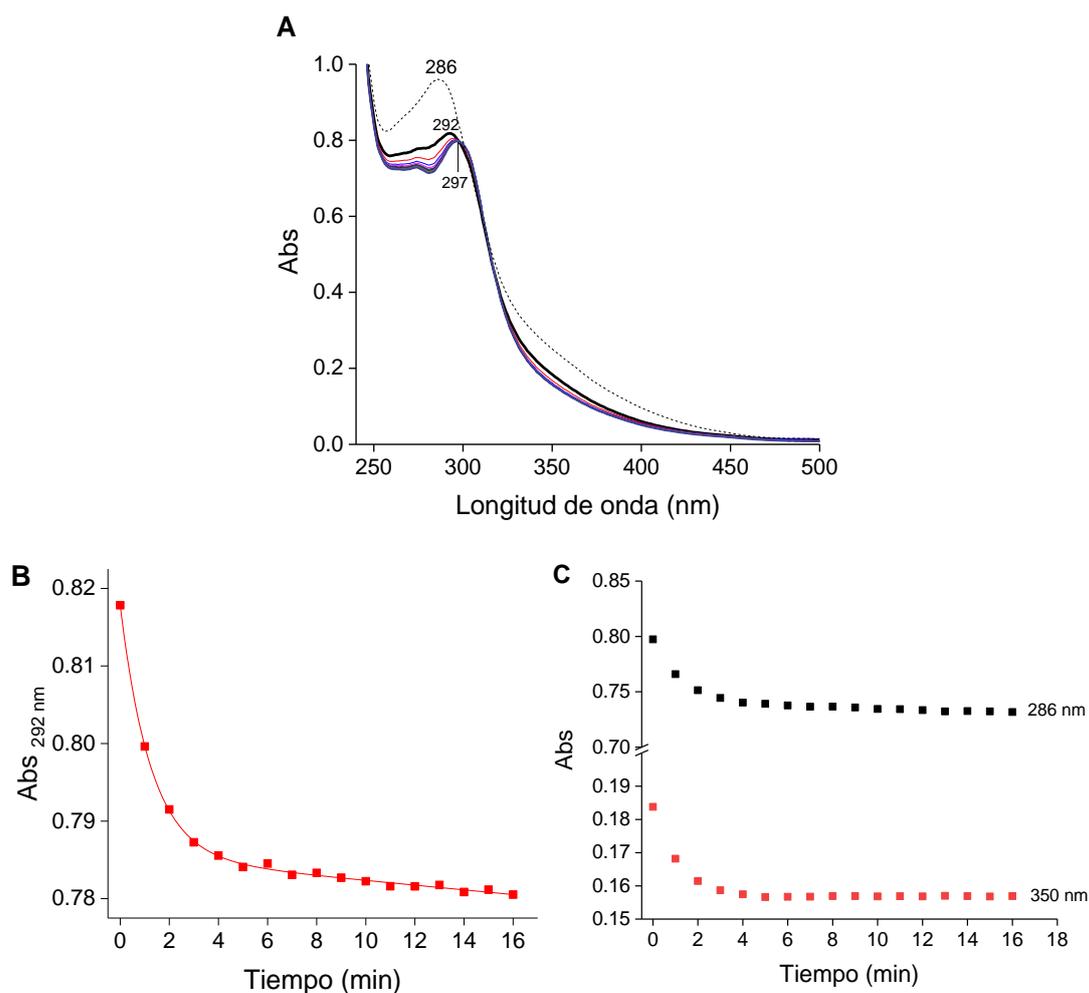


Figura 21. Reducción de los productos de reacción de omeprazol y BME. Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) y BME (50 μM) en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^{\circ}\text{C}$. A los 43 min se agregó TCEP (1 mM) y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. **A)** Espectros UV-Vis registrados cada 1 min durante 16 min luego de agregar TCEP (líneas continuas; la línea negra corresponde al primer espectro). La línea punteada corresponde al espectro de la reacción antes de agregar TCEP. Presentaron picos de absorbancia a 286 y 292 nm. **B)** Curso temporal a 292 nm correspondiente a la reacción en A. Del ajuste de una función exponencial más recta se obtuvo una constante $k_{\text{obs}} = 0.80 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ y su amplitud 0.0325 ± 0.0004 . Los valores corresponden a los parámetros \pm el error del ajuste. **C)** Cursos temporales a 286 y 350 nm a partir de la reacción A.

6.1.4 Estabilidad de la sulfenamida a pH cercano a la neutralidad

Con el objetivo de preformar la sulfenamida a pH ácido para posteriormente evaluar su reactividad a pH neutro, se determinó la estabilidad de la sulfenamida a un pH cercano a la neutralidad. La sulfenamida se preformó por incubación de omeprazol (50 μM) en HCl (0.1 o 87 mM) y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo (Figura 22A-B). El espectro obtenido para la incubación de omeprazol en HCl 0.1 mM inicialmente presentó picos a 278 y 301 nm, consistentes con el espectro del omeprazol en agua (Figura 17). Luego de la incubación se

observaron picos a longitudes de onda cercanas y un aumento relativamente pequeño de la absorbancia a 350 nm. Esto refleja que solo una parte del omeprazol se descompuso (Figura 22A). Por esta razón, se decidió incrementar la concentración de HCl.

En los espectros correspondientes a la incubación de omeprazol en HCl 87 mM, se formaron picos a 271 y 356 nm, y se observó un punto isosbético a 319 nm, sugiriendo que la formación de sulfenamida por descomposición del omeprazol en HCl relativamente concentrado se da en una sola fase (Figura 22B). Al aumento de absorbancia a 350 nm se le ajustó una función exponencial que resultó en una k_{obs} de $0.267 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ (Figura 22C). A su vez, a partir de los 10 min se observó un descenso lento en la absorbancia a 350 nm, que sugería que la sulfenamida estaba decayendo (Figura 22C).

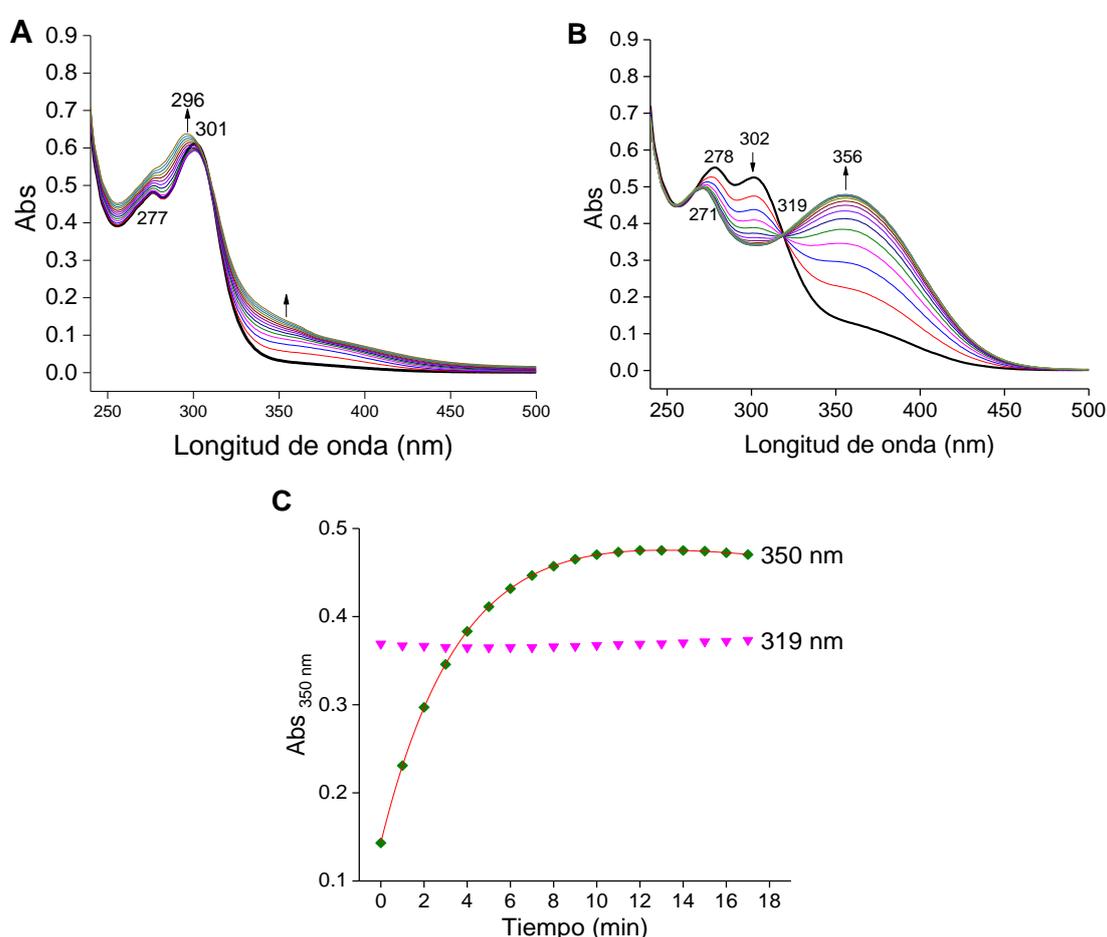


Figura 22. Formación de la sulfenamida en HCl. Espectros de absorbancia de la descomposición de omeprazol (50 μM) en HCl **A)** 0.1 o **B)** 87 mM, a 25 °C. Los espectros fueron registrados cada 1 min, durante 12 y 16 min, respectivamente. La línea negra corresponde al primer espectro, presentó picos a 277 y 301 nm en la reacción **A**, y picos a 278 y 302 nm en la reacción **B**. El último espectro determinado en la reacción **B** presentó picos a 271 y 356 nm. Presentaron un punto isosbético a 319 nm. **C)** Cursos temporales correspondientes a la reacción en **B**. A partir del ajuste de una función exponencial más recta al curso temporal a 350 nm se obtuvo una k_{obs} de $0.267 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ y amplitud de 0.384 ± 0.001 . Los valores corresponden a los parámetros \pm el

error del ajuste.

De los espectros de formación de sulfenamida (Figura 22B), la ley de Lambert-Beer (Ec. 8) y asumiendo que se formó tanta sulfenamida como omeprazol había inicialmente (50 μM), se calculó una absorptividad molar de $6545 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la sulfenamida en HCl 87 mM.

Posteriormente, se preformó sulfenamida a partir de omeprazol (50 μM) incubado en HCl (71 mM) durante 13 min, y se incubaron en agua o en amortiguador Tris (0.5 M, pH 7.4), alícuotas de la mezcla de reacción que contenía sulfenamida preformada, registrándose los espectros de absorbancia durante 7 y 12 min, respectivamente (Figura 23). Para la dilución en agua se observaron cambios menores, alcanzándose luego de 12 min un espectro con picos a 273, 292 y 352 nm (Figura 23A). En el caso de la dilución en amortiguador a pH 7.4, el primer espectro registrado mostró ya un cambio notorio respecto a la sulfenamida en HCl 87 mM, obteniéndose picos de absorbancia a 276 y 291 nm que no cambiaron en los siguientes 7 min (Figura 23B). Estos resultados muestran que la sulfenamida decae rápidamente a pH 7.4. Por lo tanto, no parece conveniente realizar un diseño experimental que implique la preformación de la sulfenamida a pH ácido para luego incubarla a pH cercano a la neutralidad en presencia de BME o H_2S con el fin de estudiar las reacciones con éstos, pues la sulfenamida decae en presencia de amortiguador. Estos resultados coinciden con los reportados en trabajos previos, donde se determinó que la sulfenamida se descompone a pH mayor a 4 y que la velocidad de descomposición aumenta con el pH [4].

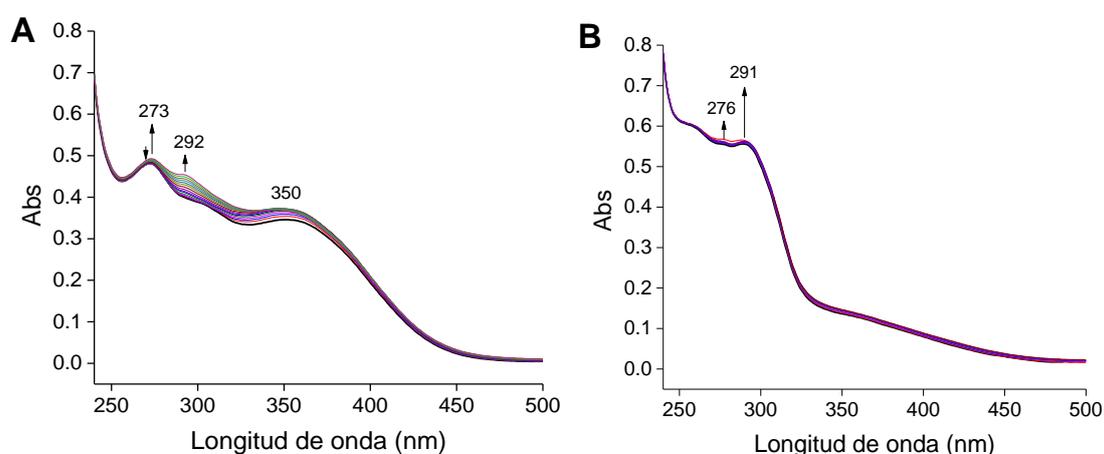


Figura 23. Estabilidad de la sulfenamida a pH cercano a la neutralidad. Espectros de absorbancia correspondientes a una alícuota de la sulfenamida preformada en HCl 71 mM, diluida en **A)** agua y en **B)** amortiguador Tris (0.5 M, pH 7.4). Se registraron espectros cada 54 s durante 12 y 7 min, respectivamente. Los espectros determinados para la reacción A presentaron picos a 273, 292 y 350

nm, mientras que para la reacción *B* presentaron picos a 276 y 291 nm.

6.1.5 *Reacción de omeprazol con H₂S*

Para evaluar si el omeprazol reacciona con el H₂S, se agregó omeprazol (50 μM) a soluciones de H₂S en exceso (rango de concentraciones de 73 a 500 μM) a pH 4.5, y se registraron espectros de absorbancia UV-Vis en el tiempo (Figura 24A-E). Los resultados presentaron diferencias a los observados para el decaimiento de omeprazol solo (Figura 18) y en presencia de BME (Figuras 19 y 20). A diferencia de esos casos, con H₂S no se observó la formación de un pico en la zona de 284-287 nm, sino alrededor de 298-300 nm. Además, no se observó con claridad la disminución de absorbancia en la región 300-315 nm. En cambio, especialmente a las concentraciones mayores de H₂S, se observó un aumento de la absorbancia a todas las longitudes de onda, incluso a 450-500 nm donde el omeprazol y sus derivados no absorben. Esto indica la aparición de turbiedad. Además, en presencia de H₂S 500 μM, la absorbancia a 350 nm no aumentó en la forma exponencial simple que sí se observó con BME 500 μM (Figuras 24E y 19B). A su vez, se descartó que el aumento de absorbancia en todo el rango de longitudes de onda se debía a la solución de H₂S, ya que un control con H₂S 200 μM en las mismas condiciones no absorbió a longitudes de onda mayores a 270 nm (Figura 24F), eliminándose la posibilidad que hubiera impurezas o productos de oxidación en la solución de H₂S, que pudieran enturbiar la mezcla.

La complejidad del proceso de reacción con exceso estequiométrico de H₂S no permitió estudiar las etapas separadamente, por lo tanto no se puede descartar que la reacción de H₂S ocurra con una especie diferente a la sulfenamida, como el ácido sulfénico.

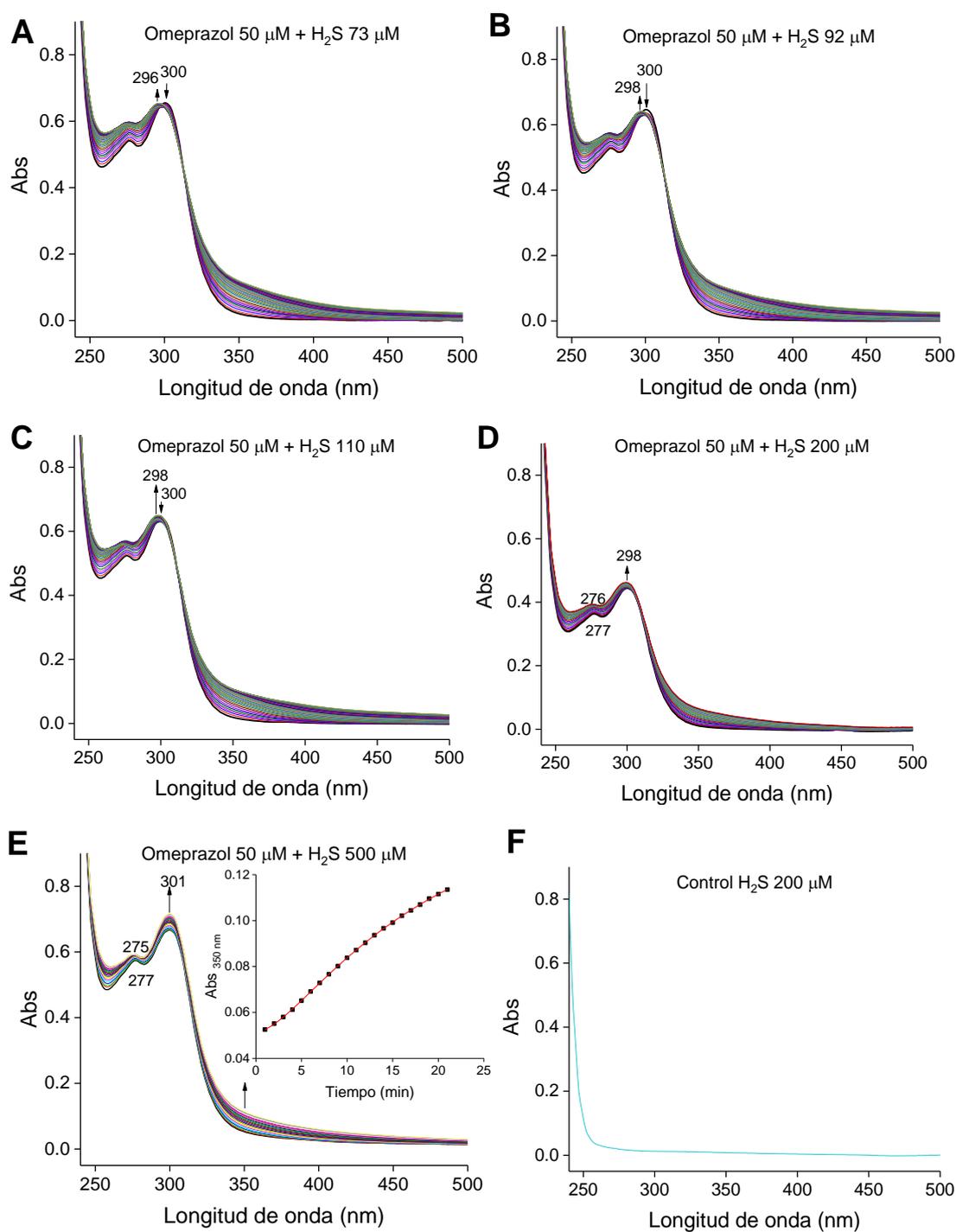


Figura 24. Espectros UV-Vis de la reacción de omeprazol y H_2S en exceso. A-E) Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) y un exceso de H_2S (73 - 500 μM) en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^\circ\text{C}$, y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo cada 1 min, durante 24 min. Inserto de E: curso temporal a 350 nm. **F)** Espectro UV-Vis de H_2S (200 μM) en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^\circ\text{C}$.

Adicionalmente, se registraron espectros UV-Vis para la reacción de omeprazol (50 μM) con concentraciones subestequiométricas o equimolares de H_2S (18-50 μM) (Figura 25). En estos

casos no se observó la aparición de turbiedad, lo cual sugiere que es necesario que reaccione más de un H_2S con derivados del omeprazol para que aparezca. Los espectros de las reacciones que contienen H_2S en concentraciones subestequiométricas (Figura 25A-B) se asemejan a la descomposición de omeprazol solo a pH 4.5 o en presencia de BME. En cambio los espectros obtenidos a partir de concentraciones equimolares de ambos reactivos (Figura 25C) difirieron del espectro correspondiente a la descomposición de omeprazol solo o en presencia de BME (Figuras 18, 19 y 20), ya que se observa una menor acumulación de especies que absorben a 284 y 350 nm, las cuales podrían tratarse de la sulfenamida o el disulfuro mixto, producto de la reacción con BME (Figura 13, D). En el caso del curso temporal a 350 nm obtenido con 50 μM de H_2S , pudo ser ajustada una función exponencial simple (Ec. 10). Se obtuvo una k_{obs} de $0.0490 \pm 0.0005 \text{ min}^{-1}$. Este valor, similar a los obtenidos con omeprazol solo o BME, sugiere que la formación de sulfenamida también está limitando la reacción con H_2S .

Se puede especular que es de esperar que H_2S al pH de trabajo pueda reaccionar más rápidamente que BME, ya que los pK_a de dichas especies son 7 y 9.6, respectivamente, por lo tanto hay una mayor proporción de HS^- que de tiolato, las cuales corresponden a 0.32 y 0.01 %. Sin embargo, el HS^- es un peor nucleófilo que los tiolatos debido a que le falta el efecto inductivo del grupo metileno presente en los tiolatos [46]. En este sentido, es de esperar que la nucleofilia se correlacione con la basicidad y el HS^- es menos básico que el tiolato de BME. Por otra parte, es de esperar que la reacción con la sulfenamida revierta rápidamente, pues el HS^- es un mejor saliente que el tiolato del BME, debido a su menor pK_a .

En suma, de los resultados obtenidos hasta ahora, se deduce que existe reacción entre la sulfenamida derivada del omeprazol y H_2S , que la reacción presenta diferencias con la de BME y que aparece turbiedad cuando el H_2S está en exceso.

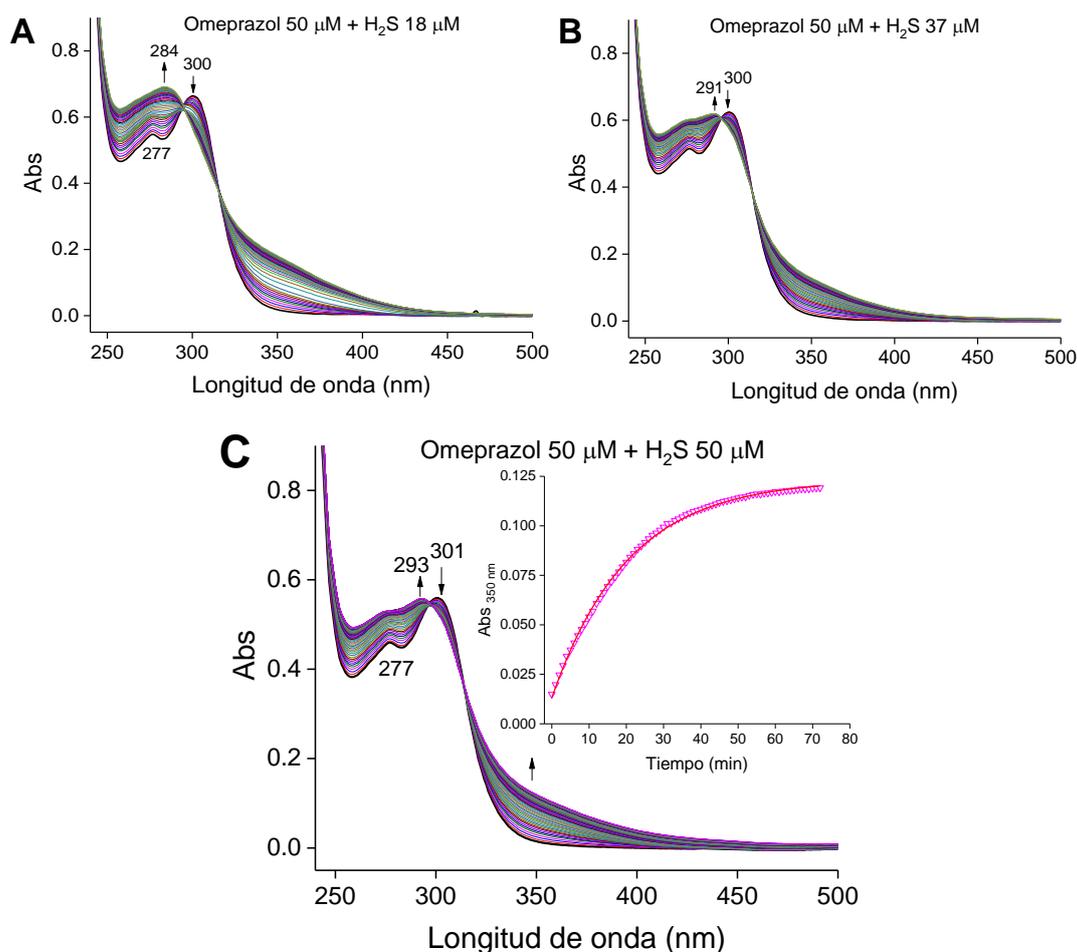


Figura 25. Espectros UV-Vis de la reacción de omeprazol y H₂S subestequiométrico o equimolar. Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) y H₂S (18, 37 o 50 μM) en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 °C, y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo cada 1 min, durante 72 min. Inserto de C: ajuste de una función exponencial al curso temporal, del cual se obtuvo una constante $k_{obs} = 0.0490 \pm 0.0005 \text{ min}^{-1}$ y el valor absoluto de la amplitud de 0.1102 ± 0.0004 . Los valores corresponden a los parámetros \pm el error del ajuste.

La turbiedad que se generó en las reacciones de omeprazol con exceso de H₂S (Figura 24) pudo ser revertida ante un agregado de reductor (Figura 26). El agregado de TCEP llevó a un descenso general en la absorbancia de la mezcla a todas las longitudes de onda, que se puso de manifiesto especialmente en la zona de 350 y 274 nm. A su vez, los espectros obtenidos a partir de la incubación con TCEP presentaron picos de absorbancia a 300 y 274 nm, y no presentaron absorbancia a 350 nm, lo cual sugiere que con TCEP se forma una especie que no presenta un alto nivel de conjugación, probablemente el tioéter (Figura 13, E).

En su conjunto, los resultados sugieren que la turbiedad podría deberse a la presencia de azufre elemental (S₈). También sugieren la presencia de persulfuros y polisulfuros entre los productos de reacción, considerando que se reducen por TCEP y absorben a 350 nm [81], pudiendo

contribuir a la absorbancia en esa región.

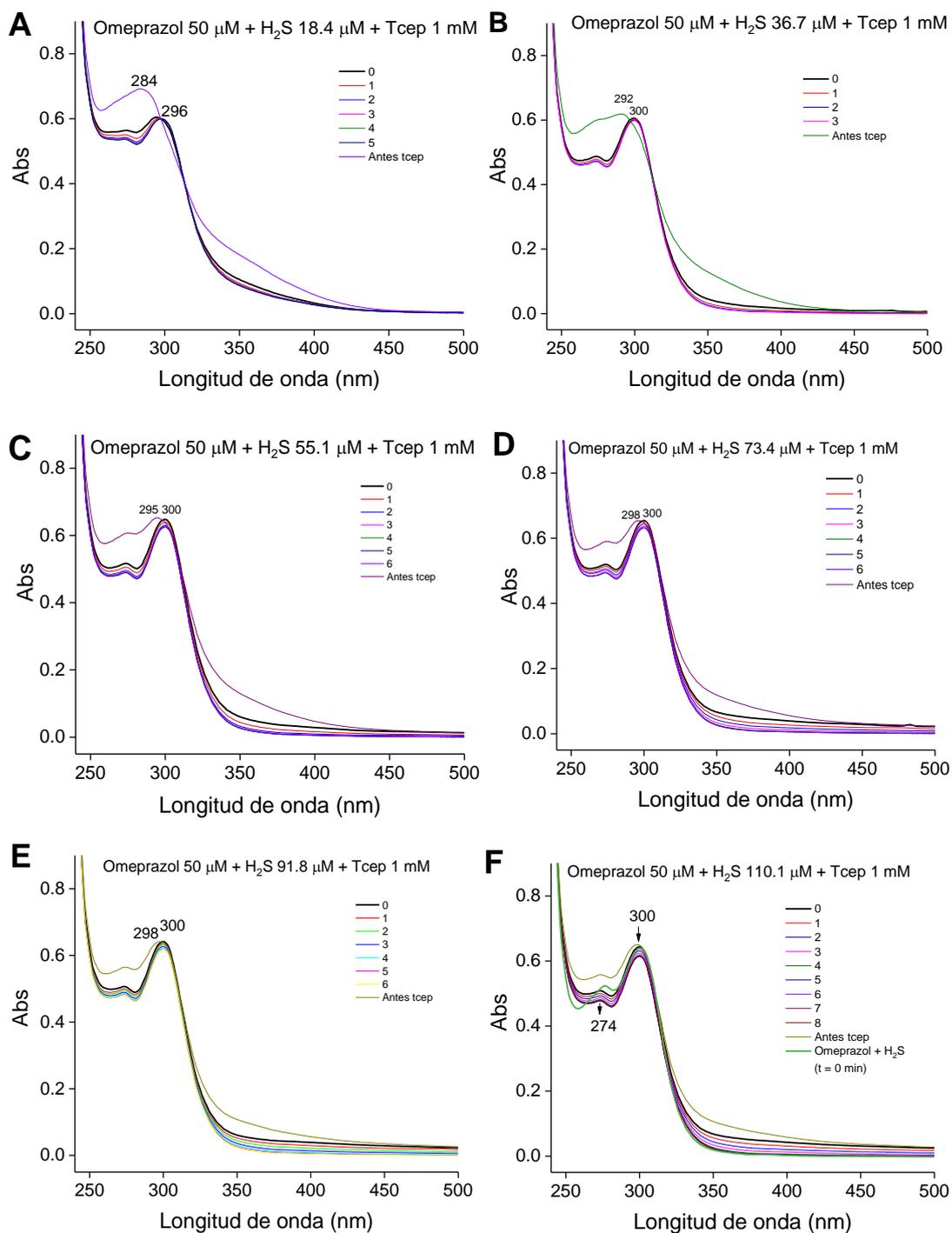


Figura 26. Reacción de omeprazol y H_2S en presencia de reductor. Se puso a reaccionar omeprazol (50 μM) con concentraciones variables de H_2S (18-110 μM) en citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^\circ\text{C}$. Posteriormente dichas muestras fueron expuestas al reductor TCEP. Se registraron espectros UV-Vis cada 1 min, durante 3-8 min.

A partir de los resultados obtenidos se estableció una nueva hipótesis para la reacción del

omeprazol con H_2S , representada en la Figura 27. Se plantea que el persulfuro derivado del omeprazol (F), además de formar el disulfuro (G), sería capaz de reaccionar con otra molécula de H_2S para liberar H_2S_2 y formar el tioéter que se produce en la reacción de omeprazol con tioles (E). El H_2S_2 podría producir polisulfuros de mayor longitud de cadena y eventualmente azufre elemental (S_8), consistente con la turbiedad observada y su desaparición ante el agregado de un reductor. Por otro lado, se plantea que el disulfuro (G) podría ser reducido en por H_2S o TCEP formando dos tioles (H-I). El tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol (H) se encuentra disponible comercialmente, permitiendo evaluar su formación en las mezclas de omeprazol y H_2S con distintas técnicas, utilizándolo como estándar.

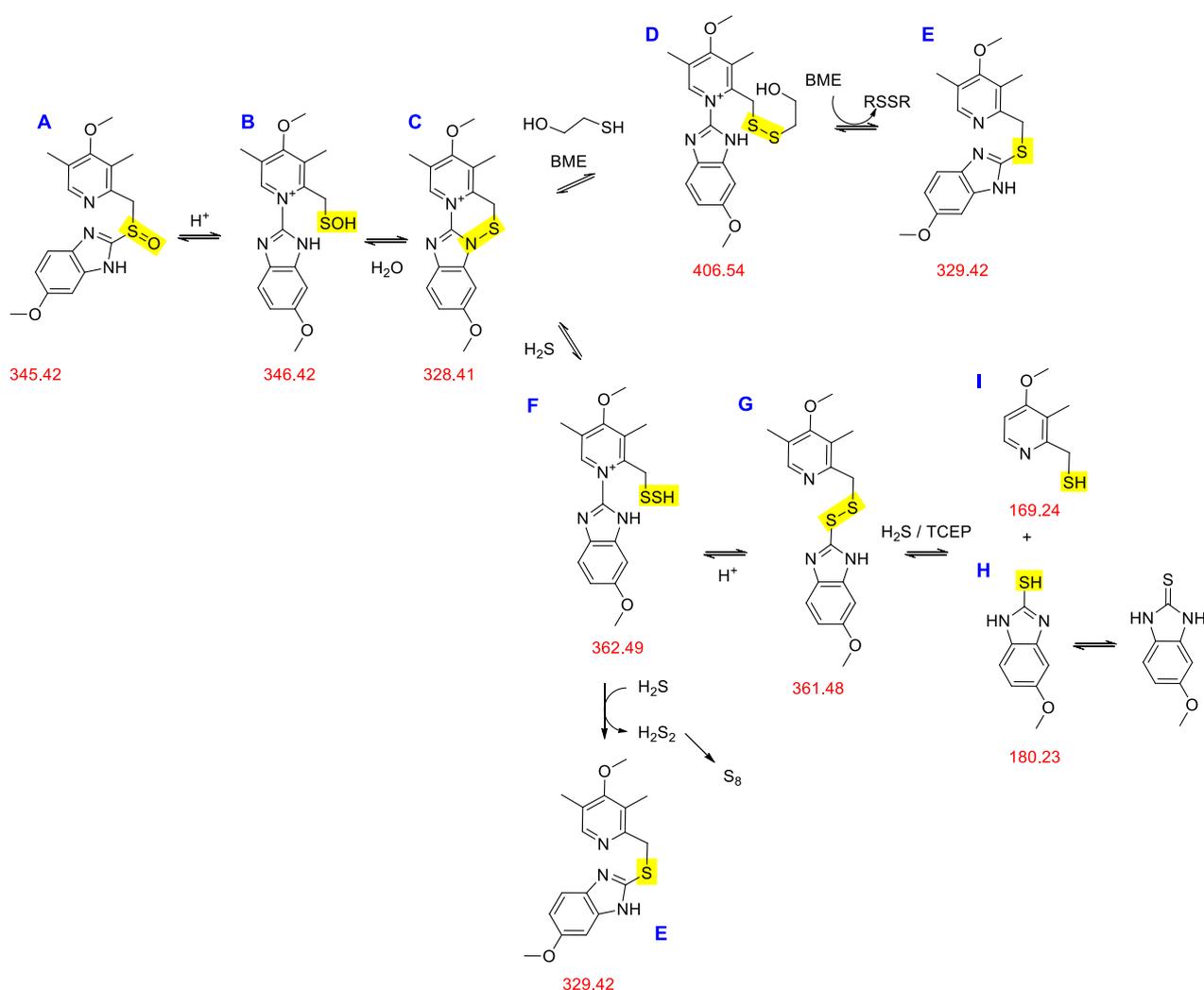


Figura 27. Hipótesis de reacción de omeprazol con H_2S . Posibles reacciones de descomposición del omeprazol a pH ácido, en presencia de tioles (superior) y en presencia de H_2S (inferior). Debajo de cada especie se muestra la masa molecular.

6.2 HPLC

Con la finalidad de caracterizar a los productos de la reacción de omeprazol con H_2S , se realizaron estudios de HPLC de fase reversa. A partir de un estándar de omeprazol ($50 \mu\text{M}$) incubado en citrato (0.1 M , $\text{pH } 4.5$) durante 7 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, se determinó un tiempo de retención de 6.3 min para el omeprazol (Figura 28A). El espectro de absorbancia asociado al pico del cromatograma es consistente con que sea omeprazol (Figura 28A, *inserto*). El agregado de un exceso de TCEP al omeprazol resultó en la formación de una especie con un tiempo de retención de 10.1 min (Figura 28B), cuyo espectro presentó un máximo que coincide con el del omeprazol solo, sin embargo ambos espectros presentan máximos relativos a diferentes longitudes de onda. Este resultado sugiere que el omeprazol, o más específicamente la sulfenamida derivada, es capaz de reaccionar con el TCEP. Respecto al producto formado, se presume que se trata del tioéter derivado del omeprazol (Figura 27, E). En este sentido, los espectros de las especies con tiempos de retención de 6.3 y 10.1 min resultaron muy similares, compatible con las similitudes estructurales entre el sulfóxido (A) y el tioéter (E) del omeprazol. Por su parte, el pico de 10.1 min no presentó absorbancia a 350 nm , lo cual permite descartar que se trate de la sulfenamida, que además se prevé que eluya antes que el omeprazol debido a la presencia de una carga en el piridonio.

Por otra parte, se determinó un tiempo de retención de 2.9 min para el tiol 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol ($50 \mu\text{M}$, Figura 27, H) incubado en citrato (0.1 M , $\text{pH } 4.5$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 29).

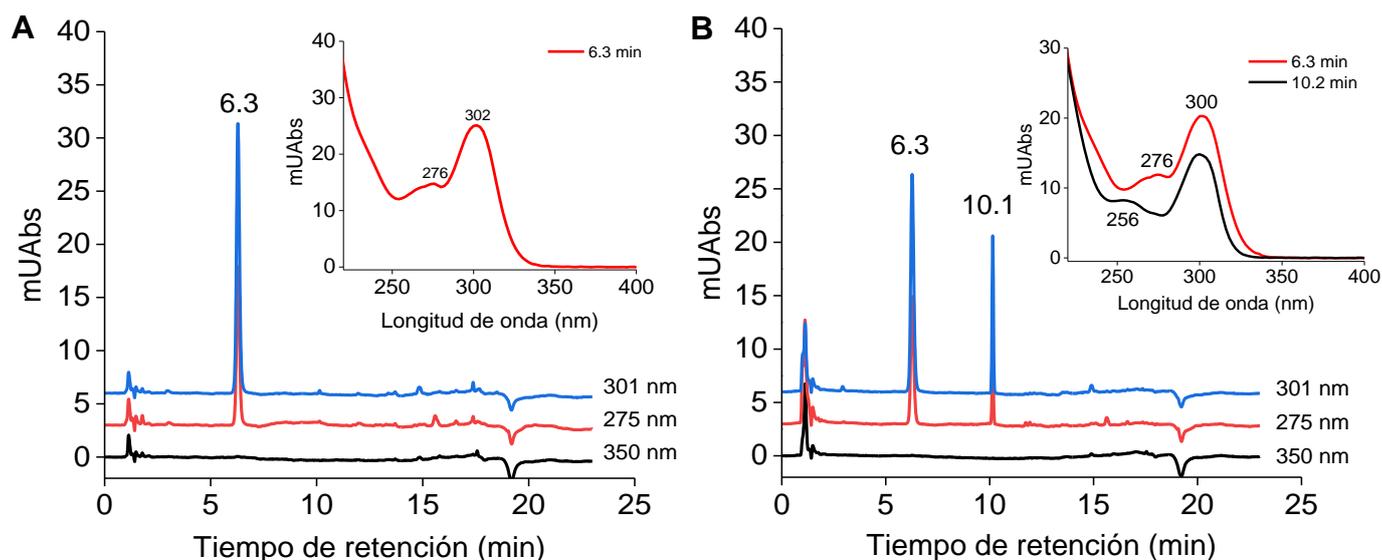


Figura 28. Descomposición de omeprazol en citrato. **A)** Cromatogramas de HPLC de fase reversa de omeprazol (50 μ M) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5), incubado durante 7 min a 25 $^{\circ}$ C. **B)** Cromatograma de la mezcla anterior expuesta a TCEP (0.5 mM) durante 4 min. Se inyectaron diluciones en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (100 mM). *Inserto:* Espectros de los picos a 6.3 y 10.1 min.

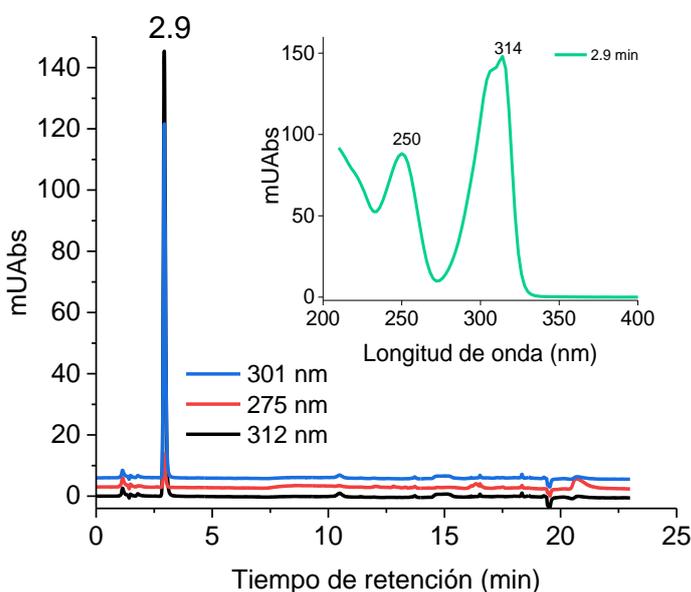


Figura 29. Cromatograma de 5-metoxi-2-mercaptobenzimidazol en citrato. Cromatograma de HPLC de fase reversa de un estándar de tiol 5-metoxi-2-mercaptobenzimidazol (50 μ M) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) a 25 $^{\circ}$ C. Se inyectó una dilución en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (35 mM). *Inserto:* espectro UV-Vis del pico a 2.9 min.

Luego, se registraron los cromatogramas de las mezclas de omeprazol con H_2S a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C para intentar determinar los productos de la reacción. El cromatograma de una muestra con

concentraciones equimolares de omeprazol y H₂S, incubada durante 35 min, presentó el pico correspondiente al omeprazol remanente (tiempo de retención de 6.3 min) y otro pico con tiempo de retención de 10.1 min, tanto en ausencia (Figura 30A) como en presencia de TCEP (Figura 30B). El pico de 10.1 min, que se observó también en mezclas de omeprazol y TCEP (Figura 28A), se trata seguramente del tioéter derivado del omeprazol (Figura 27, E). Por otro lado, de la comparación de muestras incubadas con H₂S durante períodos iguales (14 min), se observó que el área del pico de 10.1 min aumentó tanto con la concentración de H₂S (Figuras 31A y 32A), consistente con que el omeprazol y un exceso de H₂S generen tioéter y H₂S₂, como con el agregado de TCEP (Figuras 31B y 32B), consistente con la formación de tioéter por la reacción de omeprazol y TCEP (Figura 28B) así como con el aumento de H₂S al reducir H₂S₂. Cabe destacar que en la reacción de omeprazol con H₂S (Figuras 30-32) no se evidenció la formación de 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol (tiempo de retención 2.9 min) (Figura 29).

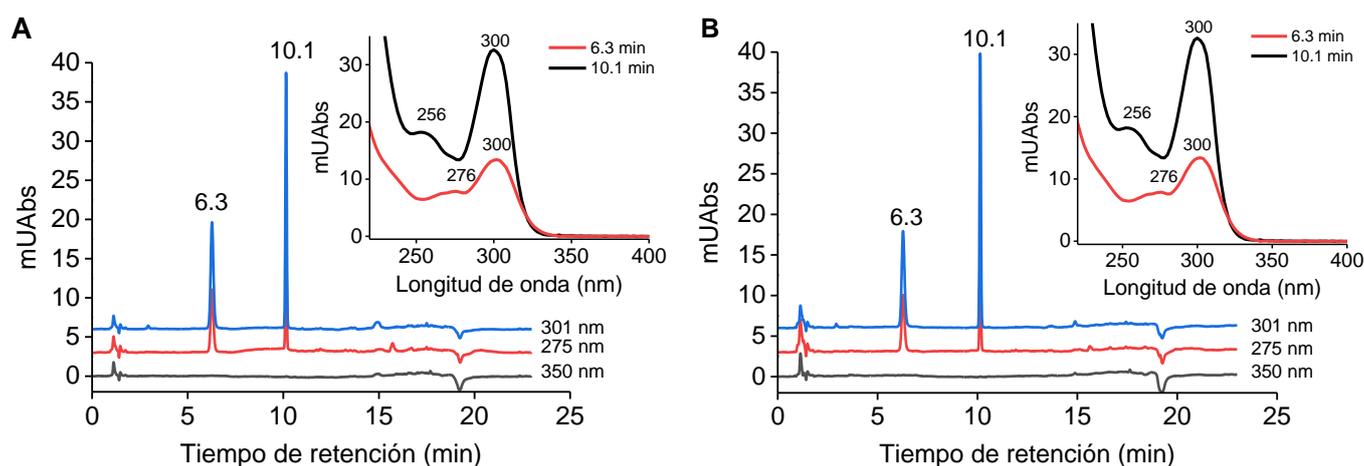


Figura 30. Reacción de omeprazol y H₂S en concentraciones equimolares. **A)** Cromatogramas de HPLC de omeprazol (50 μM) y H₂S (50 μM) preincubados en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) durante 35 min a 25 °C. **B)** Cromatograma de la mezcla anterior expuesta a TCEP 1 mM durante 4 min. Se inyectaron diluciones en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (100 mM). *Inserto:* espectros de los picos a 6.3 y 10.1 min.

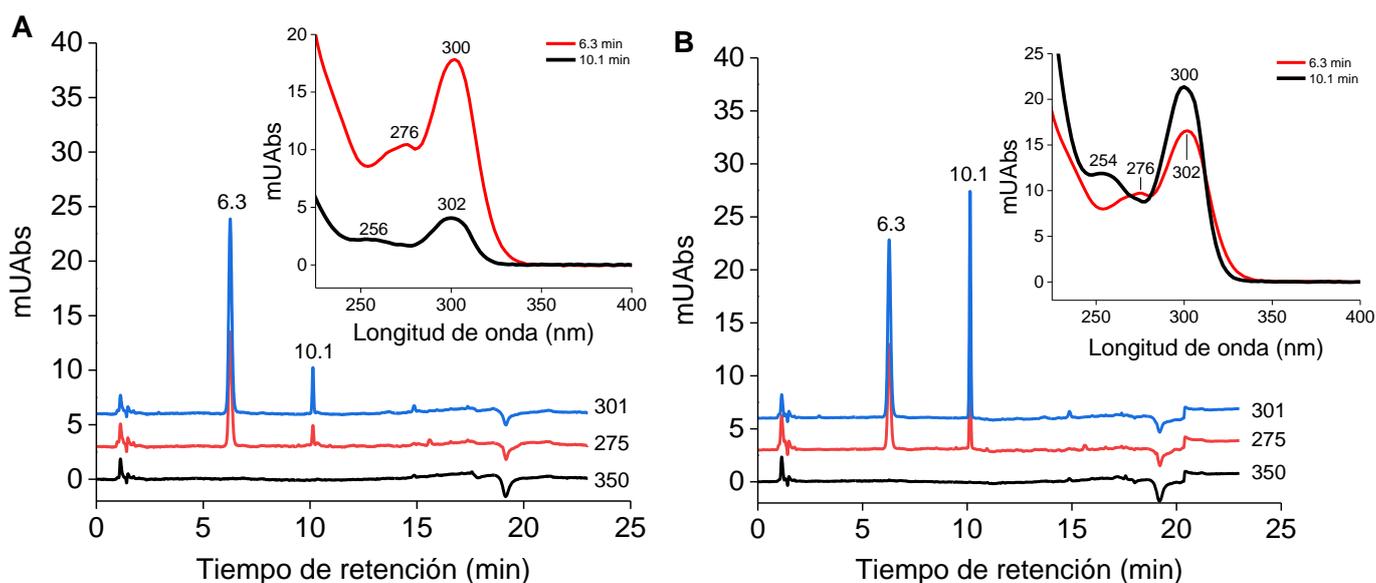


Figura 31. Reacción de omeprazol y H₂S en concentraciones subestequiométricas. **A)** Cromatogramas de HPLC de la mezcla de omeprazol (50 μ M) y H₂S (20 μ M) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5), incubada durante 14 min a 25 °C. **B)** Cromatograma de la mezcla anterior expuesta a TCEP (1 mM) durante 4 min. Se inyectaron diluciones en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (100 mM). *Inserto:* Espectros de los picos a 6.3 y 10.1 min.

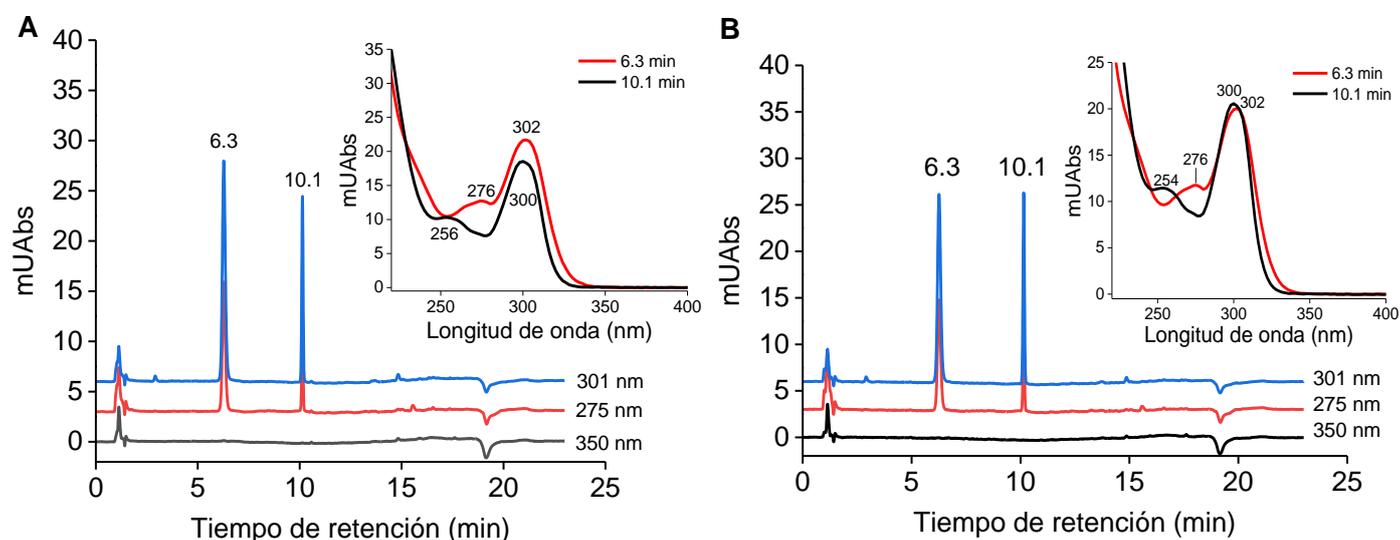


Figura 32. Reacción de omeprazol y H₂S en exceso. **A)** Cromatogramas de HPLC de la mezcla de omeprazol (50 μ M) y H₂S (200 μ M) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5), incubadas durante 14 min a 25 °C. **B)** Cromatograma de la mezcla anterior expuesta a TCEP (4 mM) durante 4 min. Se inyectaron diluciones en acetonitrilo (30 %) y bicarbonato de amonio (100 mM). *Inserto:* Espectros de los picos a 6.3 y 10.1 min.

En su conjunto, los resultados de HPLC sugieren que la reacción del omeprazol y H₂S produce el tioéter derivado (Figura 27, E).

6.3 Espectrometría de masas

Para continuar con la caracterización de los productos formados en la reacción de omeprazol con H₂S, se realizaron experimentos de espectrometría de masas. En primer lugar, se analizó una muestra de omeprazol en agua. Se observó una especie con una relación masa/carga (m/z) de 345.8 (Figura 33A), consistente con el derivado monocargado del omeprazol, el cual tiene una masa molecular promedio de 345.42 Da y una monoisotópica de 345.11 Da. Además del omeprazol, se detectaron especies con m/z de 157.0, 178.9, 238.4 y 333.1, que podrían ser contaminantes del omeprazol. El patrón de fragmentación (Figura 33B) sugirió que los iones derivados mayoritarios se originan por ruptura de los enlaces entre el azufre y los carbonos que lo flanquean, destacándose una especie con m/z de 198.1 que contendría el sulfóxido original.

Posteriormente, se analizó una muestra de omeprazol preincubada a pH 4.5. Como amortiguador se utilizó acetato de amonio (50 mM, pH 4.5), por ser más adecuado para el ensayo que el citrato debido a su volatilidad. En esta muestra se detectó al omeprazol (Figura 33C-D). Además, se detectaron especies con m/z de 156.9, 178.8, 238.6 y 332.2 que fueron asignadas a contaminantes del omeprazol, ya que también se vieron en los espectros de omeprazol en agua (Figura 33A) pero no en los espectros de los solventes, acetato de amonio y agua (Figura 33K). No se observó un pico consistente con la sulfenamida, cuyo m/z esperado sería de 328.41.

El espectro de masa de la reacción de omeprazol y H₂S en concentraciones equimolares fue analizado luego de 8 y 43 min de incubación en acetato de amonio. A los 43 min se observó una especie con m/z de 329.8 (Figura 33F), la cual no fue evidenciada a los 8 min de incubación (Figura 33E) y podría corresponder al tioéter (Figura 27, E), cuyo m/z esperado es de 330.4. El espectro obtenido para la fragmentación del ion con $m/z = 329.8$ coincide con la fragmentación esperada para el tioéter (Figura 33G); se destaca la presencia de un ion con m/z de 181.6, que sería el equivalente a la especie con m/z 198.1 generada a partir del omeprazol, pero sin el oxígeno. En los espectros de la reacción de omeprazol y H₂S (Figura 33E-F) no se evidenció la formación de 5-metoxi-2-mercaptobencimidazol (m/z esperado de 181.2, Figura 27, H) ni del persulfuro intermediario (m/z esperado de 362.5, Figura 27, F) ni del disulfuro (m/z esperado de 362.5, Figura 27, G). Se analizó una mezcla de omeprazol con concentraciones subestequiométricas de H₂S para favorecer esta vía de reacción y obtener el persulfuro, el disulfuro y el tiol, pero tampoco se observaron (Figura 33H,I).

También se analizó la reacción de omeprazol con un exceso de BME. Se obtuvo una especie con m/z de 406.1 (Figura 33J) consistente con el disulfuro mixto (m/z esperado de 406.5, Figura 27,

D). El tioéter (m/z 330.4) se observó en forma solo minoritaria, sugiriendo que la reducción del disulfuro mixto por BME es lenta a pH ácido.

Estos experimentos permitieron concluir que la reacción de omeprazol (más concretamente de la sulfenamida del omeprazol) con H_2S produce como producto mayoritario el tioéter (Figura 27, *E*). En otras palabras, el H_2S reduce el sulfóxido del omeprazol al tioéter correspondiente.

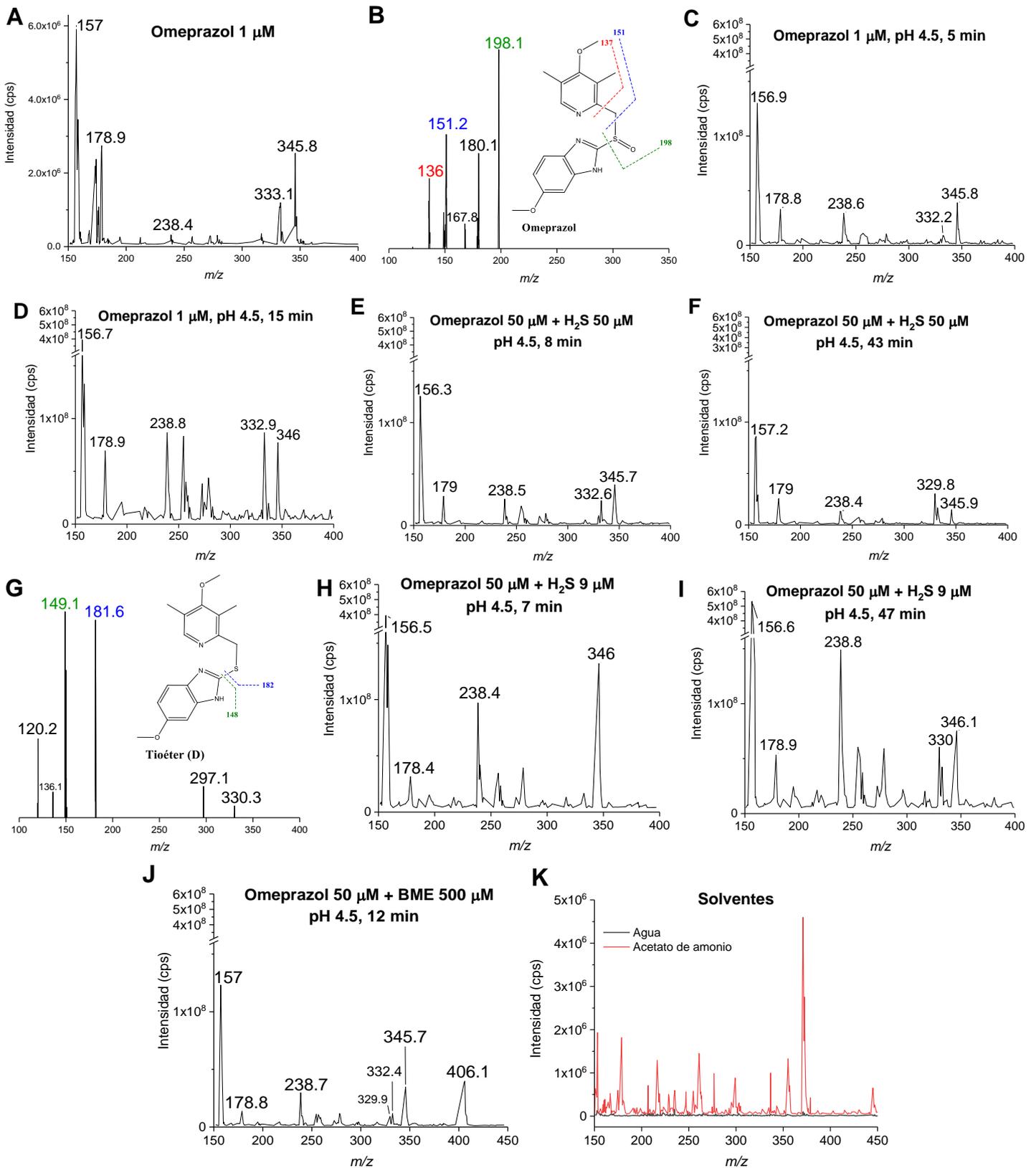


Figura 33. Análisis por espectrometría de masas. Espectros de masa de omeprazol 1 μM en agua (A) y patrón de fragmentación del omeprazol ($m/z = 346$ en A) (B). Espectros de masa de omeprazol 1 μM en agua, previamente incubado en acetato de amonio (pH 4.5, 25 °C) durante 5 (C) o 15 min (D). Espectros de masas de diluciones 1:50 en agua de reacciones en acetato de amonio de omeprazol (50 μM) con H₂S 50 μM a los 8 (E) o 43 min (F); con H₂S 9 μM a los 7 (H) o 47 min (I) o con BME 500 μM a los 12 min (J). G) Patrón de fragmentación de la especie con $m/z = 330$ en F. K) Espectros de masa de los solventes: agua y acetato de amonio.

6.4 Cianólisis fría

El método de cianólisis fría es una técnica empleada para cuantificar azufre sulfano. Se define como azufre sulfano a los átomos de azufre que se encuentran formando enlace con otros dos átomos de azufre o con un azufre y un hidrógeno ionizable [82]. En la cianólisis fría, las muestras son incubadas con cianuro (CN^-) a pH alcalino (entre 8.5 y 10) y temperatura ambiente para formar tiocianato (SCN^-) según la Ec. 12 (con persulfuro como ejemplo de compuesto con azufre sulfano). Posteriormente se agrega Reactivo de Goldstein a la muestra, que contiene iones férricos (Fe^{3+}) a pH ácido. El tiocianato formado y los iones férrico reaccionan formando un complejo coloreado, $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ (Ec. 13), cuya formación puede seguirse espectrofotométricamente a 460 nm. La cuantificación del complejo se realiza con una curva de calibración utilizando estándares de tiocianato [82].



Algunas moléculas con azufre sulfano son el azufre elemental (S_8), los persulfuros (RSSH), como en el caso de la especie *F* del esquema de reacciones (Figura 27), y los per/polisulfuros inorgánicos, H_2S_n ($n \geq 2$). Las especies que dan resultados positivos con la cianólisis fría son los persulfuros, polisulfuros, tiosulfonatos de arilo y politionatos, mientras que los tiosulfonatos, tiosulfatos y tritionatos de alquilo reaccionan muy lentamente, por lo cual dan resultados positivos con la cianólisis caliente (incubación con cianuro en baño de agua en ebullición) o en presencia de catalizadores [82]. Adicionalmente, se ha reportado que el azufre elemental puede ser detectado mediante cianólisis [83].

Con el fin de evaluar la hipótesis de que la reacción de omeprazol y H_2S forma polisulfuros y azufre elemental, los productos se analizaron por el método de cianólisis fría. Se analizó una reacción de omeprazol (50 μM) con H_2S (500 μM) en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) incubada durante 40 min a 25 °C por duplicado. Se realizaron controles de omeprazol y de H_2S solos en las mismas condiciones. Las muestras fueron expuestas a una concentración final de FeCl_3 27 mM y HNO_3 6.3 % y se registraron sus espectros de absorbancia (Figura 34A,B). Una de las mezclas de reacción formó 129.5 μM de azufre sulfano, calculado a partir de una curva de calibración de tiocianato realizada el día del experimento en las mismas condiciones (Figura 34C,D). La otra mezcla de reacción formó azufre sulfano pero no presentó diferencias

significativas en comparación con los controles de omeprazol solo (probablemente debido a errores de manipulación), que formaron aparentemente $36 \pm 6 \mu\text{M}$ (promedio \pm dispersión) (Figura 34B). Por otro lado, no se detectó azufre sulfano en los controles de H_2S (Figura 34B), dando la pauta de que los stocks utilizados no tenían polisulfuros contaminantes. A partir de la curva de calibración se determinó que el valor de la pendiente es $(377 \pm 5) \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (pendiente \pm error del ajuste) (Figura 34D).

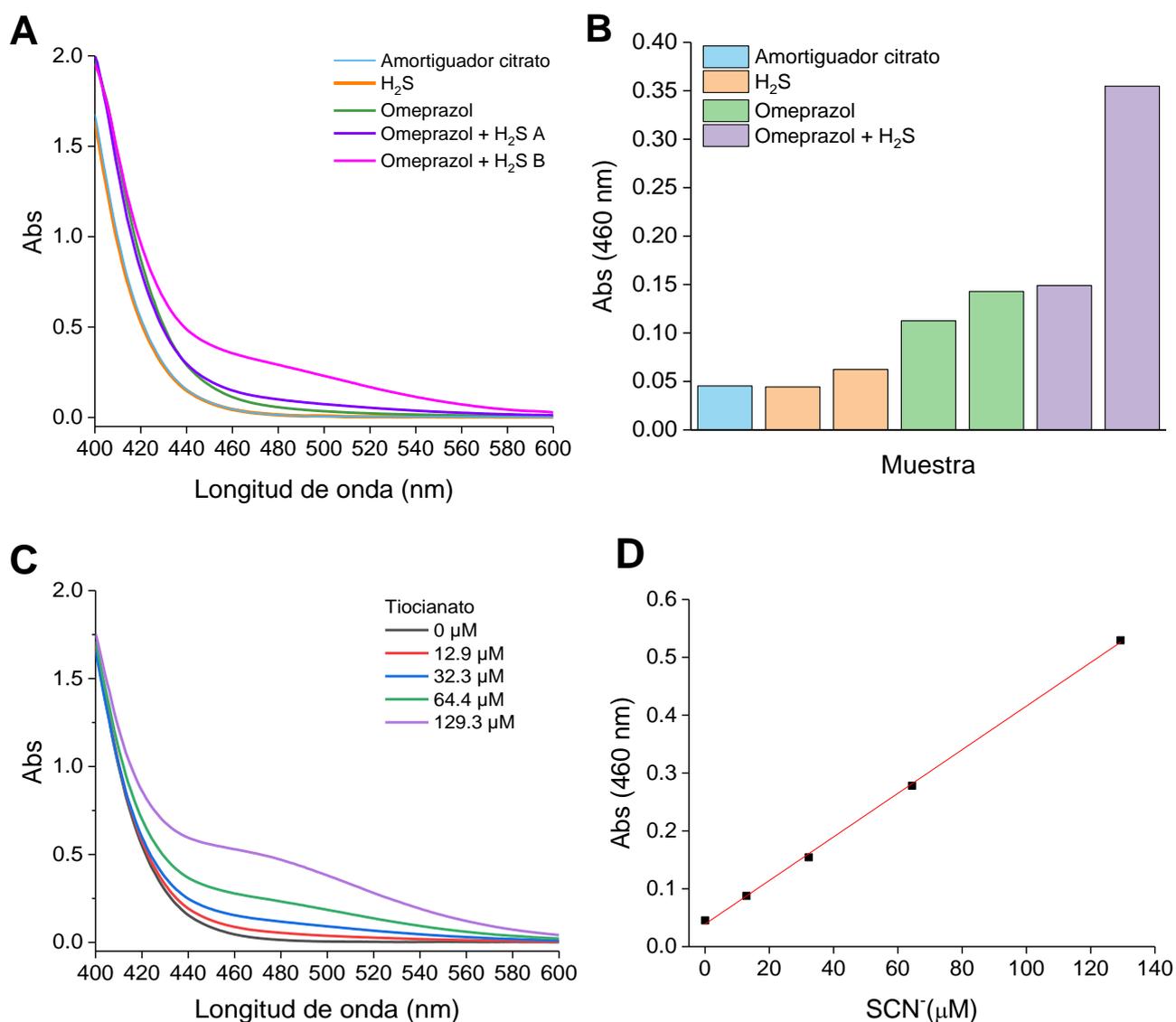


Figura 34. Determinación de azufre sulfano por el método de la cianólisis fría en las mezclas de reacción de omeprazol y H_2S . **A)** Espectros de absorbancia de las mezclas correspondientes a omeprazol solo ($50 \mu\text{M}$), H_2S solo ($500 \mu\text{M}$) u omeprazol ($50 \mu\text{M}$) con H_2S ($500 \mu\text{M}$) en amortiguador citrato (0.1 M , $\text{pH } 4.5$) o amortiguador solo, preincubados a 25°C durante 40 min . Las muestras se realizaron por duplicado. **B)** Absorbancias a 460 nm obtenidas para cada muestra. **C)** Espectros de absorbancia de estándares de tiocianato. **D)** Curva de calibración de tiocianato, pendiente = $(377 \pm 5) \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ordenada en el origen = 0.039 ± 0.004 (parámetros \pm error del ajuste).

Para favorecer la formación del complejo $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$, se realizaron ensayos de cianólisis fría utilizando mayores concentraciones de omeprazol (0.25 mM) y de H_2S (1.0 mM). A su vez, se compararon diferentes amortiguadores (citrato y acetato de amonio 0.1 M) a pH 4.5, para descartar interferencias del citrato con el hierro férrico que estuvieran afectando la absorbancia a 460 nm. Los resultados sugieren que se forma azufre sulfano en la reacción de omeprazol y H_2S , pues la absorbancia a 460 nm es mayor que la del control de omeprazol solo (Figura 35). Además, se observó una mayor absorbancia en la reacción en citrato en comparación a la reacción en acetato de amonio entre 400 y 475 nm, posiblemente debido a la formación de un complejo entre citrato y los iones Fe^{3+} . Considerando que los experimentos de espectrofotometría y HPLC se realizaron en citrato y que su interferencia en la absorbancia a 460 nm fue muy pequeña, se decidió continuar utilizando citrato como amortiguador de la reacción.

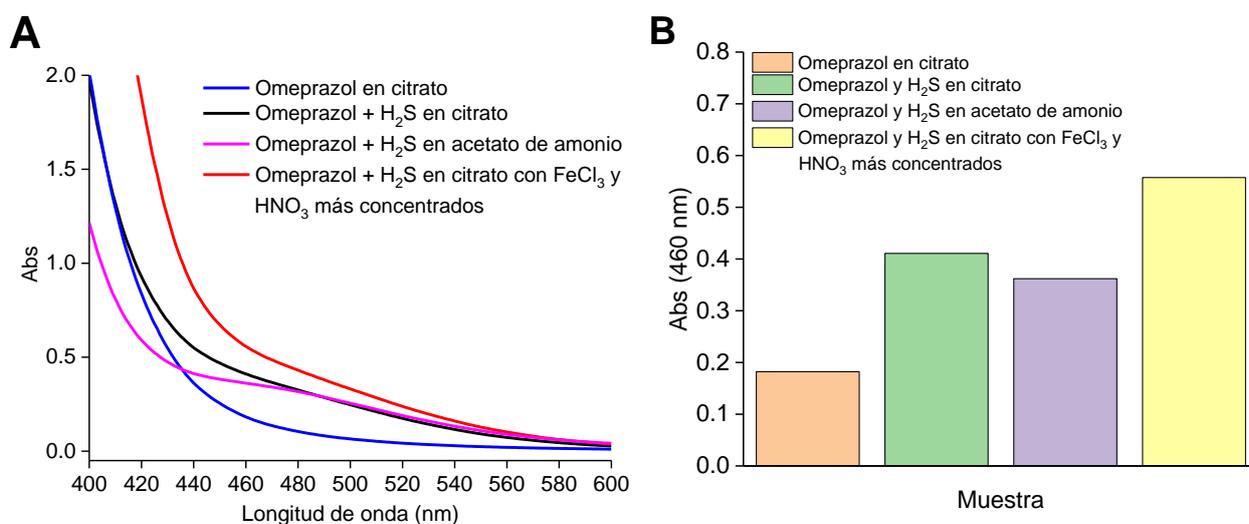


Figura 35. Evaluación de posibles interferencias de los amortiguadores citrato y acetato de amonio en el método de cianólisis fría. A) Cianólisis fría a una reacción de omeprazol 0.25 mM y H_2S 1.0 mM en amortiguador citrato o acetato de amonio (0.1 M, pH 4.5) preincubados a 25 °C durante 40 min (o 50 min en el caso del espectro en rojo). Las muestras fueron expuestas a FeCl_3 10 mM y HNO_3 2.8 % (o FeCl_3 27 mM y HNO_3 6.3 % en el caso del espectro en rojo). **B)** Absorbancias a 460 nm obtenidas para cada muestra de A.

El experimento de cianólisis fría se repitió por triplicado utilizando 0.25 mM de omeprazol con 1 mM de H_2S y los controles correspondientes. En este ensayo, las muestras fueron expuestas a una concentración final de FeCl_3 10 mM y HNO_3 2.8 % (Figura 36A,B).

Las muestras de omeprazol y H₂S formaron $206 \pm 14 \mu\text{M}$ (promedio \pm desvío estándar, $n = 3$) de azufre sulfano, determinado a partir de la curva de calibración realizada el mismo día del experimento y en las mismas condiciones. Se concluye que la reacción de omeprazol y H₂S forma compuestos con azufre sulfano, a diferencia de lo observado para la reacción de omeprazol y BME, así como en los controles de H₂S (Figura 36B). Por otro lado, en los controles de omeprazol se detectó absorbancia a 460 nm que podría corresponder a azufre sulfano, aunque en una concentración de $87.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$, significativamente menor que la obtenida para las reacciones de omeprazol y H₂S. La formación de azufre sulfano por omeprazol solo podría deberse a que, a pH ácido, se descompone formando una gran cantidad de productos entre los que alguno podría contener azufre sulfano [4].

A partir de la curva de calibración de tiocianato (Figura 36C,D), se determinó el valor de pendiente de $(220 \pm 7) \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (pendiente \pm error del ajuste) para el complejo $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$. Este valor difiere del obtenido con la curva de calibración del experimento anterior, el cual fue de $(377 \pm 5) \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (pendiente \pm error del ajuste), (Figura 34D), lo cual puede deberse a que el complejo $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ es débil, ya que posee una constante de equilibrio de formación (K_{eq}) de 708 a 25 °C [84]. Además, se ha reportado que posee una baja absorptividad y que su formación puede verse afectada por la presencia de cloruro y por las condiciones en que fueron preparadas las muestras [81]. Por lo tanto, los valores de absorptividad molar obtenidos en ambas curvas de calibración no son comparables, pues fueron elaboradas distinto día y con diferentes concentraciones de Reactivo de Goldstein.

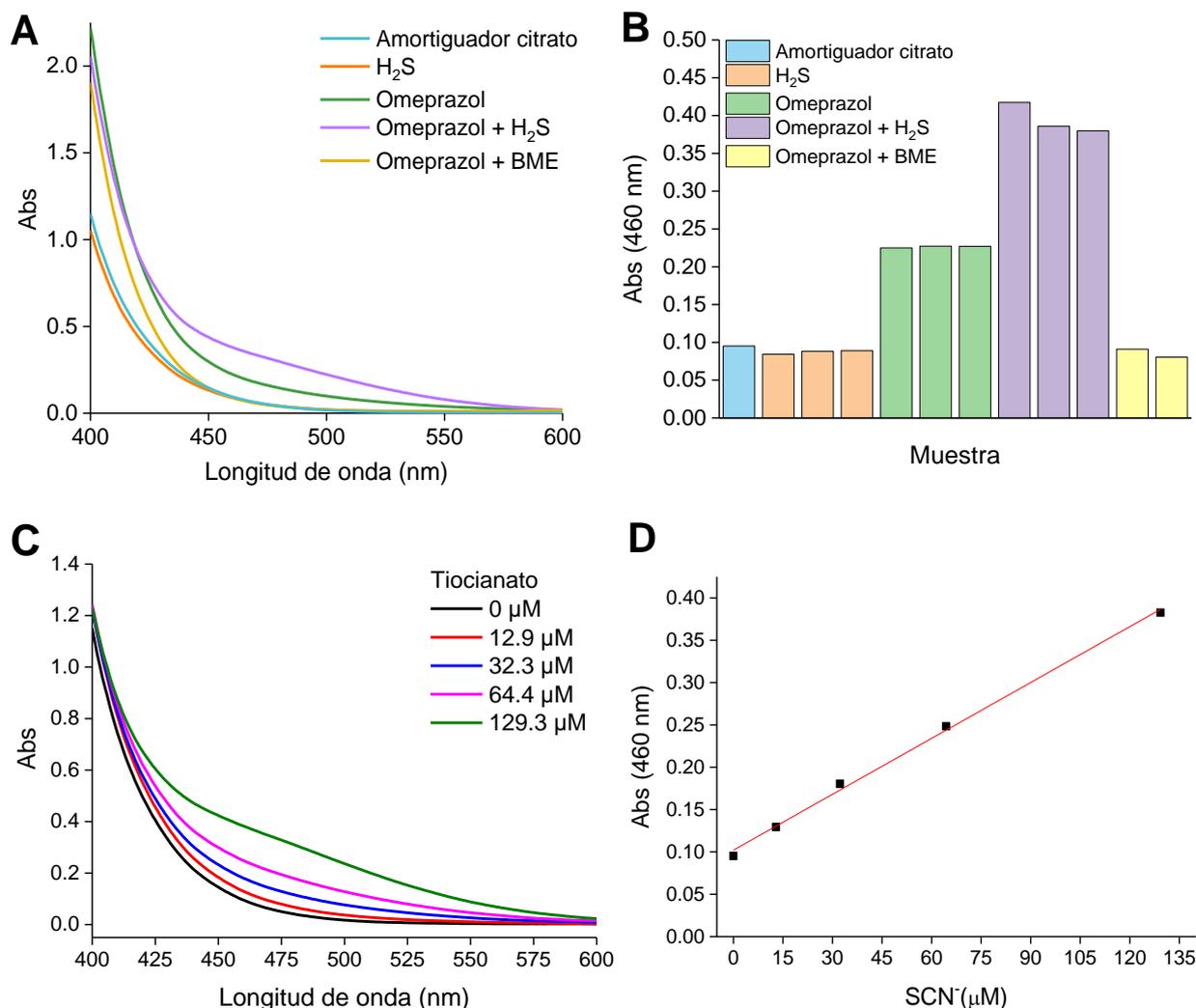


Figura 36. Determinación de azufre sulfano por el método de la cianólisis fría en las mezclas de reacción de omeprazol y H₂S. **A)** Espectros de absorbancia representativos de omeprazol solo (0.25 mM), H₂S solo (1 mM), omeprazol (0.25 mM) con H₂S (1 mM) u omeprazol (0.25 mM) con BME (1 mM), en amortiguador citrato (0.1 M, pH 4.5) o amortiguador solo, preincubados a 25 °C durante 40 min. **B)** Absorbancias a 460 nm obtenidas para cada muestra de A. **C)** Espectros de absorbancia de estándares de tiocianato. **D)** Curva de calibración de tiocianato, pendiente = $(220 \pm 7) \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ y ordenada en el origen 0.102 ± 0.004 (parámetros \pm error del ajuste).

Los resultados de cianólisis fría proveen evidencia para la formación de azufre sulfano en la reacción de omeprazol con concentraciones altas de H₂S. Esto sugiere que se genera azufre elemental y/o polisulfuros. A su vez, la formación de azufre elemental a partir de los polisulfuros explicaría la aparición de turbiedad en los espectros UV-Vis (Figura 24).

7 Conclusiones

En este trabajo se demostró que el omeprazol y el H₂S reaccionan a pH ácido. La hipótesis propuesta inicialmente planteaba la formación de un disulfuro como producto de reacción (Figura 13, *G*) y de un persulfuro (Figura 13, *F*) intermediario. Si bien no fue posible evidenciar la formación de dichas especies, los ensayos de HPLC y espectrometría de masas demostraron que la reacción produce el tioéter derivado del omeprazol (Figura 13, *E*). Esta especie también puede ser generada por la reacción del omeprazol con tioles y otros reductores como TCEP. Con experimentos de cianólisis fría, se evidenció asimismo la formación de compuestos con azufre sulfano, sugiriendo la formación de azufre elemental y/o polisulfuros. Los resultados en su conjunto apoyan la segunda hipótesis planteada (Figura 27), que sugiere que el omeprazol, más precisamente la sulfenamida derivada, reacciona con el H₂S generando un persulfuro y que éste reacciona con una segunda molécula de H₂S para formar el tioéter y H₂S₂, el cual puede dar origen a otros polisulfuros y azufre elemental. La reacción entre el omeprazol y el H₂S es compleja, siendo poco probable que presente relevancia biológica o que pueda ser utilizada como método de detección de H₂S, ya que ocurre en una escala de tiempo de minutos, requiere concentraciones de H₂S mayores que las fisiológicas y genera un producto que también puede formarse con otros reductores. En resumen, se concluye que el H₂S es capaz de reducir a la forma sulfóxido del omeprazol a la forma tioéter, oxidándose a especies con azufre sulfano como polisulfuros y azufre elemental.

8 Agradecimientos

A mis orientadoras, Beatriz y Dayana, por todo lo aprendido en este tiempo, por la dedicación, por darme la oportunidad de realizar esta tesina con ustedes y compartir su pasión por la ciencia.

A Mauricio Mastrogiovanni por su ayuda indispensable con los experimentos de espectrometría de masas y a Matías Möller por su ayuda con el HPLC.

A todos los integrantes de los laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica por haberme hecho sentir parte desde el primer día y por siempre estar dispuestos a brindar su ayuda.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, por siempre darme ánimos e impulsarme a seguir adelante.

A mis amigas de toda la vida, Lucía, Ludmila, Flor, Ángeles y Nadia.

A mis amigos de la carrera, Santiago, Laura, Belén Islas, Loli, Belén Márquez y Marcel, que hicieron mucho más fácil y divertido este camino.

9 Referencias

- [1] Olbe, L.; Carlsson, E.; Lindberg, P. A Proton-Pump Inhibitor Expedition: The Case Histories of Omeprazole and Esomeprazole. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 132–139.
- [2] Abelö, A.; Andersson, T.B.; Antonsson, M.; Naudot, A.K.; Skånberg, I.; Weidolf, L. Stereoselective Metabolism of Omeprazole by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **2000**, *28*, 966–972.
- [3] Lindberg, P.; Nordberg, P.; Alminger, T.; Brändström, A.; Wallmark, B. The Mechanism of Action of the Antisecretory Agent Omeprazole. *Journal of Medicinal Chemistry*. *1986*, *29*, 1327–1329.
- [4] Brändström, A.; Lindberg, P.; Bergman Alminger, T.; Ankner, K.; Junggren, U.; Lamm, B.; Nordberg, P.; Erickson, M.; Grundevik, I.; Hagin, I.; Hoffmann, K.; Johansson, J.; Larsson, S.; Löfberg, I.; Ohlson, K.; Persson, B.; Skånberg, I.; Tekenbergs-Hjelte, L. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. I. A Survey of Chemical Transformations of Omeprazole and Its Analogues. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 536–548.
- [5] Brändström, A.; Bergman, N.; Lindberg, P.; Grundevik, I.; Johansson, S.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Ohlson, K. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. II. Kinetics of the Reaction of Omeprazole in the Presence of 2-Mercaptoethanol. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 549–568.
- [6] Brändström, A.; Bergman, N.; Grundevik, I.; Johansson, S.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Ohlson, K. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. III. Protolytic Behaviour of Compounds in the Omeprazole System. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 569–576.
- [7] Brändström, A.; Lindberg, P.; Bergman, N.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Ohlson, K. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. IV. Reactions of Compounds of the Omeprazole System with 2-Mercaptoethanol. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 577–586.
- [8] Brändström, A.; Lindberg, P.; Bergman, N.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Ohlson, K.; Grundevik, I.; Nordberg, P.; Alminger, T. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. V. The Reaction of N-Alkylated Derivatives of Omeprazole Analogues with 2-Mercaptoethanol. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 587–594.
- [9] Brändström, A.; Lindberg, P.; Bergman, N.; Grundevik, I.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Ohlson, K. Chemical Reaction of Omeprazole and Omeprazole Analogues. VI. The Reactions of Omeprazole in the Absence of 2-Mercaptoethanol. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 595–611.
- [10] Im, W.B.; Sih, J.C.; Blakeman, D.P.; McGrath, J.P. Omeprazole, a Specific Inhibitor of Gastric (H⁺-K⁺)-ATPase, Is a H⁺-Activated Oxidizing Agent of Sulfhydryl Groups. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 4591–4597.
- [11] Engevik, A.C.; Kaji, I.; Goldenring, J.R. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. *Physiol. Rev.*, **2020**, *100*, 573–602.
- [12] Choi, E.; Roland, J.T.; Barlow, B.J.; O’Neal, R.; Rich, A.E.; Nam, K.T.; Shi, C.; Goldenring, J.R. Cell Lineage Distribution Atlas of the Human Stomach Reveals Heterogeneous Gland Populations in the Gastric Antrum. *Gut*, **2014**, *63*, 1711–1720.
- [13] Chen, D.; Zhao, C.M.; Andersson, K.; Meister, B.; Panula, P.; Håkanson, R. ECL Cell Morphology. *Yale J. Biol. Med.*, **1998**, *71*, 217–231.
- [14] Habibi, M. Acetylcholine. In: *Encyclopedia of Movement Disorders*; Elsevier, **2010**; pp. 11–14.
- [15] Code, C.F. Histamine and Gastric Secretion. In: *Novartis Foundation Symposia*; Wolstenholme, G.E.W.; O’Connor, C.M., Eds.; Wiley, **1956**; pp. 189–219.
- [16] Zeng, N.; Athmann, C.; Kang, T.; Lyu, R.-M.; Walsh, J.H.; Ohning, G.V.; Sachs, G.; Pisegna, J.R. PACAP Type I Receptor Activation Regulates ECL Cells and Gastric Acid Secretion. *J. Clin. Invest.*, **1999**, *104*, 1383–1391.

- [17] Zeng, N.; Kang, T.; Wen, Y.; Wong, H.; Walsh, J.; Sachs, G. Galanin Inhibition of Enterochromaffin-like Cell Function. *Gastroenterology*, **1998**, *115*, 330–339.
- [18] Chew, C.S. Parietal Cell Protein Kinases. Selective Activation of Type I cAMP-Dependent Protein Kinase by Histamine. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 7540–7550.
- [19] Berg, A.; Redéen, S.; Grenegård, M.; Ericson, A.-C.; Sjöstrand, S.E. Nitric Oxide Inhibits Gastric Acid Secretion by Increasing Intraparietal Cell Levels of cGMP in Isolated Human Gastric Glands. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, **2005**, *289*, G1061–G1066.
- [20] Yao, X.; Forte, J.G. Cell Biology of Acid Secretion by the Parietal Cell. *Annu. Rev. Physiol.*, **2003**, *65*, 103–131.
- [21] Shin, J.M.; Munson, K.; Vagin, O.; Sachs, G. The Gastric HK-ATPase: Structure, Function, and Inhibition. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, **2009**, *457*, 609–622.
- [22] Sawaguchi, A.; Aoyama, F.; Ide, S.; Suganuma, T. The Cryofixation of Isolated Rat Gastric Mucosa Provides New Insights into the Functional Transformation of Gastric Parietal Cells: An in Vitro Experimental Model Study. *Arch. Histol. Cytol.*, **2005**, *68*, 151–160.
- [23] Dyla, M.; Kjærgaard, M.; Poulsen, H.; Nissen, P. Structure and Mechanism of P-Type ATPase Ion Pumps. *Annu. Rev. Biochem.*, **2020**, *89*, 583–603.
- [24] Lüpfer, C.; Grell, E.; Pintschovius, V.; Apell, H.-J.; Cornelius, F.; Clarke, R.J. Rate Limitation of the Na⁺,K⁺-ATPase Pump Cycle. *Biophys. J.*, **2001**, *81*, 2069–2081.
- [25] Wallmark, B.; Sachs, G. Inhibition of the Gastric Proton Pump. In: *Proton Pump Inhibitors*; Olbe, L., Ed.; Birkhäuser Basel: Basel, **1999**; pp. 47–59.
- [26] Shin, J.M.; Sachs, G. Restoration of Acid Secretion Following Treatment with Proton Pump Inhibitors. *Gastroenterology*, **2002**, *123*, 1588–1597.
- [27] Besancon, M.; Shin, J.M.; Mercier, F.; Munson, K.; Miller, M.; Hersey, S.; Sachs, G. Membrane Topology and Omeprazole Labeling of the Gastric Hydrogen Ion-Potassium-Adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 2345–2355.
- [28] Howden, C.W. Clinical Pharmacology of Omeprazole. *Clin. Pharmacokinet.*, **1991**, *20*, 38–49.
- [29] Jones, D.B.; Howden, C.W.; Burget, D.W.; Kerr, G.D.; Hunt, R.H. Acid Suppression in Duodenal Ulcer: A Meta-Analysis to Define Optimal Dosing with Antisecretory Drugs. *Gut*, **1987**, *28*, 1120–1127.
- [30] Uemura, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S.; Matsumura, N.; Yamaguchi, S.; Yamakido, M.; Taniyama, K.; Sasaki, N.; Schlemper, R.J. *Helicobacter Pylori* Infection and the Development of Gastric Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *345*, 784–789.
- [31] Sun, Q.; Yuan, C.; Zhou, S.; Lu, J.; Zeng, M.; Cai, X.; Song, H. *Helicobacter Pylori* Infection: A Dynamic Process from Diagnosis to Treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2023**, *13*, 1257817.
- [32] De Jesus Souza, M.; De Moraes, J.A.; Da Silva, V.N.; Helal-Neto, E.; Uberti, A.F.; Scopel-Guerra, A.; Olivera-Severo, D.; Carlini, C.R.; Barja-Fidalgo, C. *Helicobacter Pylori* Urease Induces Pro-inflammatory Effects and Differentiation of Human Endothelial Cells: Cellular and Molecular Mechanism. *Helicobacter*, **2019**, *24*, e12573.
- [33] Unge, P. What Other Regimens Are Under Investigation to Treat *Helicobacter Pylori* Infection? *Gastroenterology*, **1997**, *113*, S131–S148.
- [34] Bayerdörffer, E.; Miehlke, S.; Mannes, G.A.; Sommer, A.; Höchter, W.; Weingart, J.; Heldwein, W.; Klann, H.; Simon, T.; Schmitt, W.; Bästlein, E.; Eimiller, A.; Hatz, R.; Lehn, N.; Dirschedl, P.; Stolte, M. Double-Blind Trial of Omeprazole and Amoxicillin to Cure *Helicobacter Pylori* Infection in Patients with Duodenal Ulcers. *Gastroenterology*, **1995**, *108*, 1412–1417.
- [35] Stoschus, B.; Domínguez-Muñoz, J.E.; Kalhori, N.; Sauerbruch, T.; Malfertheiner, P. Effect of Omeprazole on *Helicobacter Pylori* Urease Activity in Vivo. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **1996**, *8*, 811–813.
- [36] Fernández-Lainez, C.; De La Mora-de La Mora, I.; García-Torres, I.; Enríquez-Flores, S.;

- Flores-López, L.; Gutiérrez-Castrellón, P.; Yépez-Mulia, L.; Matadamas-Martínez, F.; De Vos, P.; López-Velázquez, G. Multilevel Approach for the Treatment of Giardiasis by Targeting Arginine Deiminase. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, 9491.
- [37] Linsky, T.W.; Fast, W. Guanidine-Modifying Enzymes in the Pentain Superfamily. In: *Comprehensive Natural Products II*; Elsevier, **2010**; pp. 125–159.
- [38] Bicker, K.L.; Thompson, P.R. The Protein Arginine Deiminases: Structure, Function, Inhibition, and Disease. *Biopolymers*, **2013**, *99*, 155–163.
- [39] Horikoshi, N.; Tachiwana, H.; Saito, K.; Osakabe, A.; Sato, M.; Yamada, M.; Akashi, S.; Nishimura, Y.; Kagawa, W.; Kurumizaka, H. Structural and Biochemical Analyses of the Human PAD4 Variant Encoded by a Functional Haplotype Gene. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2011**, *67*, 112–118.
- [40] Abe, K.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *J. Neurosci.*, **1996**, *16*, 1066–1071.
- [41] Hosoki, R.; Matsuki, N.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *237*, 527–531.
- [42] Powell, C.R.; Dillon, K.M.; Matson, J.B. A Review of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors: Chemistry and Potential Therapeutic Applications. *Biochem. Pharmacol.*, **2018**, *149*, 110–123.
- [43] Cuevasanta, E.; Benchoam, D.; Möller, M.N.; Carballal, S.; Banerjee, R.; Alvarez, B. Hydrogen Sulfide and Persulfides. In: *Redox Chemistry and Biology of Thiols*; Elsevier, **2022**; pp. 451–486.
- [44] Hughes, M.N.; Centelles, M.N.; Moore, K.P. Making and Working with Hydrogen Sulfide: The Chemistry and Generation of Hydrogen Sulfide in Vitro and Its Measurement in Vivo: A Review. *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, *47*, 1346–1353.
- [45] Cuevasanta, E.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Möller, M.N. Solubility and Permeation of Hydrogen Sulfide in Lipid Membranes. *PLoS ONE*, **2012**, *7*, e34562.
- [46] Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Coitiño, E.L.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M.R.; Alvarez, B. Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 26866–26880.
- [47] Landry, A.P.; Moon, S.; Kim, H.; Yadav, P.K.; Guha, A.; Cho, U.-S.; Banerjee, R. A Catalytic Trisulfide in Human Sulfide Quinone Oxidoreductase Catalyzes Coenzyme A Persulfide Synthesis and Inhibits Butyrate Oxidation. *Cell Chem. Biol.*, **2019**, *26*, 1515–1525.e4.
- [48] Boubeta, F.M.; Bieza, S.A.; Bringas, M.; Palermo, J.C.; Boechi, L.; Estrin, D.A.; Bari, S.E. Hemeproteins as Targets for Sulfide Species. *Antioxid. Redox Signal.*, **2020**, *32*, 247–257.
- [49] Pálincás, Z.; Furtmüller, P.G.; Nagy, A.; Jakopitsch, C.; Pirker, K.F.; Magierowski, M.; Jasnos, K.; Wallace, J.L.; Obinger, C.; Nagy, P. Interactions of Hydrogen Sulfide with Myeloperoxidase. *Br. J. Pharmacol.*, **2015**, *172*, 1516–1532.
- [50] Nicholls, P.; Kim, J.-K. Sulphide as an Inhibitor and Electron Donor for the Cytochrome c Oxidase System. *Can. J. Biochem.*, **1982**, *60*, 613–623.
- [51] Pereira, I.A.C.; Ramos, A.R.; Grein, F.; Marques, M.C.; da Silva, S.M.; Venceslau, S.S. A Comparative Genomic Analysis of Energy Metabolism in Sulfate Reducing Bacteria and Archaea. *Front. Microbiol.*, **2011**, *2*, 69.
- [52] Anantharaman, K.; Hausmann, B.; Jungbluth, S.P.; Kantor, R.S.; Lavy, A.; Warren, L.A.; Rappé, M.S.; Pester, M.; Loy, A.; Thomas, B.C.; Banfield, J.F. Expanded Diversity of Microbial Groups That Shape the Dissimilatory Sulfur Cycle. *ISME J.*, **2018**, *12*, 1715–1728.
- [53] Kushkevych, I.; Cejnar, J.; Trembl, J.; Dordević, D.; Kollar, P.; Vítězová, M. Recent Advances in Metabolic Pathways of Sulfate Reduction in Intestinal Bacteria. *Cells*, **2020**, *9*, 698.
- [54] Wang, B.; Pandey, T.; Long, Y.; Delgado-Rodriguez, S.E.; Daugherty, M.D.; Ma, D.K. Co-Opted Genes of Algal Origin Protect *C. Elegans* against Cyanogenic Toxins. *Curr. Biol.*, **2022**, *32*, 4941–4948.e3.

- [55] Kabil, O.; Banerjee, R. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 21903–21907.
- [56] Murphy, B.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. Hydrogen Sulfide Signaling in Mitochondria and Disease. *FASEB J.*, **2019**, *33*, 13098–13125.
- [57] Vitvitsky, V.; Yadav, P.K.; Kurthen, A.; Banerjee, R. Sulfide Oxidation by a Noncanonical Pathway in Red Blood Cells Generates Thiosulfate and Polysulfides. *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 8310–8320.
- [58] Yadav, P.K.; Martinov, M.; Vitvitsky, V.; Seravalli, J.; Wedmann, R.; Filipovic, M.R.; Banerjee, R. Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 289–299.
- [59] Benchoam, D.; Semelak, J.A.; Cuevasanta, E.; Mastrogiovanni, M.; Grassano, J.S.; Ferrer-Sueta, G.; Zeida, A.; Trujillo, M.; Möller, M.N.; Estrin, D.A.; Alvarez, B. Acidity and Nucleophilic Reactivity of Glutathione Persulfide. *J. Biol. Chem.*, **2020**, *295*, 15466–15481.
- [60] Ng, P.C.; Hendry-Hofer, T.B.; Witeof, A.E.; Brenner, M.; Mahon, S.B.; Boss, G.R.; Haouzi, P.; Bebarta, V.S. Hydrogen Sulfide Toxicity: Mechanism of Action, Clinical Presentation, and Countermeasure Development. *J. Med. Toxicol.*, **2019**, *15*, 287–294.
- [61] Carballal, S.; Trujillo, M.; Cuevasanta, E.; Bartesaghi, S.; Möller, M.N.; Folkes, L.K.; García-Bereguiaín, M.A.; Gutiérrez-Merino, C.; Wardman, P.; Denicola, A.; Radi, R.; Alvarez, B. Reactivity of Hydrogen Sulfide with Peroxynitrite and Other Oxidants of Biological Interest. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50*, 196–205.
- [62] Nagy, P.; Winterbourn, C.C. Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 1541–1543.
- [63] Kimura, H. Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, **2017**, *27*, 619–621.
- [64] Filipovic, M.R.; Zivanovic, J.; Alvarez, B.; Banerjee, R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 1253–1337.
- [65] Bestetti, S.; Medraño-Fernandez, I.; Galli, M.; Ghitti, M.; Bienert, G.P.; Musco, G.; Orsi, A.; Rubartelli, A.; Sitia, R. A Persulfidation-Based Mechanism Controls Aquaporin-8 Conductance. *Sci. Adv.*, **2018**, *4*, eaar5770.
- [66] Aoyama, K.; Suh, S.W.; Hamby, A.M.; Liu, J.; Chan, W.Y.; Chen, Y.; Swanson, R.A. Neuronal Glutathione Deficiency and Age-Dependent Neurodegeneration in the EAAC1 Deficient Mouse. *Nat. Neurosci.*, **2006**, *9*, 119–126.
- [67] Vandiver, M.S.; Paul, B.D.; Xu, R.; Karuppagounder, S.; Rao, F.; Snowman, A.M.; Seok Ko, H.; Il Lee, Y.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; Sen, N.; Snyder, S.H. Sulfhydration Mediates Neuroprotective Actions of Parkin. *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 1626.
- [68] Imai, Y.; Soda, M.; Takahashi, R. Parkin Suppresses Unfolded Protein Stress-Induced Cell Death through Its E3 Ubiquitin-Protein Ligase Activity. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 35661–35664.
- [69] Wallace, J.L.; Dickey, M.; McKnight, W.; Martin, G.R. Hydrogen Sulfide Enhances Ulcer Healing in Rats. *FASEB J.*, **2007**, *21*, 4070–4076.
- [70] Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Distrutti, E.; Rizzo, G.; Mencarelli, A.; Orlandi, S.; Zanardo, R.; Renga, B.; Di Sante, M.; Morelli, A.; Cirino, G.; Wallace, J.L. Inhibition of Hydrogen Sulfide Generation Contributes to Gastric Injury Caused by Anti-Inflammatory Nonsteroidal Drugs. *Gastroenterology*, **2005**, *129*, 1210–1224.
- [71] Shen, F.; Zhao, C.-S.; Shen, M.-F.; Wang, Z.; Chen, G. The Role of Hydrogen Sulfide in Gastric Mucosal Damage. *Med. Gas Res.*, **2019**, *9*, 88.
- [72] Gobert, A.P.; Latour, Y.L.; Asim, M.; Finley, J.L.; Verriere, T.G.; Barry, D.P.; Milne, G.L.; Luis, P.B.; Schneider, C.; Rivera, E.S.; Lindsey-Rose, K.; Schey, K.L.; Delgado, A.G.; Sierra, J.C.; Piauelo, M.B.; Wilson, K.T. Bacterial Pathogens Hijack the Innate Immune Response by Activation of the Reverse Transsulfuration Pathway. *mBio*, **2019**, *10*, e02174-19.

- [73] Hardbower, D.M.; Asim, M.; Luis, P.B.; Singh, K.; Barry, D.P.; Yang, C.; Steeves, M.A.; Cleveland, J.L.; Schneider, C.; Piazuolo, M.B.; Gobert, A.P.; Wilson, K.T. Ornithine Decarboxylase Regulates M1 Macrophage Activation and Mucosal Inflammation via Histone Modifications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, *114*.
- [74] Kawahara, Y.; Hirashita, Y.; Tamura, C.; Kudo, Y.; Sakai, K.; Togo, K.; Fukuda, K.; Matsunari, O.; Okamoto, K.; Ogawa, R.; Mizukami, K.; Okimoto, T.; Kodama, M.; Murakami, K. *Helicobacter Pylori* Infection Modulates Endogenous Hydrogen Sulfide Production in Gastric Cancer AGS Cells. *Helicobacter*, **2020**, *25*, e12732.
- [75] Shalchi, R.; Hosseini, R.; Gholipouri, C. *Helicobacter Pylori* and Halitosis: A Comparative Quasiexperimental Clinical Trial Study. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **2012**, *6*, 892–896.
- [76] Lee, H.; Kho, H.-S.; Chung, J.-W.; Chung, S.-C.; Kim, Y.-K. Volatile Sulfur Compounds Produced by *Helicobacter Pylori*. *J. Clin. Gastroenterol.*, **2006**, *40*, 421–426.
- [77] Cuevasanta, E.; Reyes, A.M.; Zeida, A.; Mastrogiovanni, M.; De Armas, M.I.; Radi, R.; Alvarez, B.; Trujillo, M. Kinetics of Formation and Reactivity of the Persulfide in the One-Cysteine Peroxiredoxin from *Mycobacterium Tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, **2019**, *294*, 13593–13605.
- [78] Turell, L.; Steglich, M.; Torres, M.J.; Deambrosi, M.; Antmann, L.; Furdui, C.M.; Schopfer, F.J.; Alvarez, B. Sulfenic Acid in Human Serum Albumin: Reaction with Thiols, Oxidation and Spontaneous Decay. *Free Radic. Biol. Med.*, **2021**, *165*, 254–264.
- [79] Gupta, V.; Carroll, K.S. Sulfenic Acid Chemistry, Detection and Cellular Lifetime. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **2014**, *1840*, 847–875.
- [80] Riener, C.K.; Kada, G.; Gruber, H.J. Quick Measurement of Protein Sulfhydryls with Ellman's Reagent and with 4,4'-Dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, *373*, 266–276.
- [81] Benchoam, D.; Cuevasanta, E.; Semelak, J.A.; Mastrogiovanni, M.; Estrin, D.A.; Möller, M.N.; Alvarez, B. Disulfides Form Persulfides at Alkaline pH Leading to Potential Overestimations in the Cold Cyanolysis Method. *Free Radic. Biol. Med.*, **2023**, *207*, 63–71.
- [82] Wood, J.L. Sulfane Sulfur. In: *Methods in Enzymology*; Elsevier, **1987**; Vol. 143, pp. 25–29.
- [83] Bartlett, P.D.; Davis, R.E. Reactions of Elemental Sulfur. II. The Reaction of Alkali Cyanides with Sulfur, and Some Single-Sulfur Transfer Reactions¹. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 2513–2516.
- [84] De Berg, K.; Maeder, M.; Clifford, S. The Thermodynamic Formation Constants for Iron(III) Thiocyanate Complexes at Zero Ionic Strength. *Inorganica Chim. Acta*, **2017**, *466*, 249–253.