



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Reactividad de sulfuro de hidrógeno y moléculas relacionadas frente a mioglobina como modelo de hemoproteínas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de
Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Lic. Juan Cruz Palermo

Directora de tesis: Dra. Sara Elizabeth Bari

Consejero de estudios: Dr. Mario Tagliazucchi

Lugar de trabajo: Instituto de Química de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de presentación: Buenos Aires, 18/06/2024

Lic. Juan Cruz Palermo

Dra. Sara E. Bari

A mi familia,
A mis colegas,
A mi Patria,

**“Hay muchas similitudes entre
el desarrollo del conocimiento en un niño y
el desarrollo del conocimiento en la ciencia”.**

Jean Piaget

Reactividad de sulfuro de hidrógeno y moléculas relacionadas frente a mioglobina como modelo de hemoproteínas.

Resumen:

El sulfuro de hidrógeno, H_2S , es una molécula de interés biológico creciente desde finales del siglo XX, cuando fue reportada su biosíntesis en mamíferos. Desde entonces, sus funciones y mecanismos de acción son objeto de activa investigación. Forma parte de una tríada de señalizadores endógenos, junto al óxido nítrico, NO, y al monóxido de carbono, CO. Las hemoproteínas están entre los destinos bioquímicos que se conocen para el H_2S . El trabajo de Tesis que se presenta estuvo centrado en el estudio de la reacción de especies reactivas inorgánicas de azufre frente a la mioglobina férrica, MbFe^{III} , como modelo de hemoproteínas, procurando contribuir a la descripción de interacciones químicas de potencial relevancia biológica.

El Capítulo 1 procura presentar el estado del arte en propiedades químicas generales y reactividad de compuestos azufrados inorgánicos frente a compuestos hémicos.

El Capítulo 2 aborda el estudio de la reactividad del H_2S y su par conjugado hidrosulfuro, HS^- , frente a MbFe^{III} desde el punto de vista cinético y mecanístico. Se estudió la reacción de reducción de MbFe^{III} a MbFe^{II} , mediada por soluciones de sulfuro de sodio anhidro en condiciones anóxicas. La reducción sigue una traza cinética sigmoidea asimétrica, que revela la existencia de un mecanismo autocatalítico complejo. El análisis de cada etapa nos permitió estimar parámetros cinéticos fenomenológicos del inicio y del proceso global, y proponer un mecanismo de reacción para las condiciones experimentales empleadas. Los métodos cinéticos fueron complementados con análisis espectroscópico, evaluación de la presencia de radicales, y evaluación química de intermediarios y productos finales. Además, se recurrió a cálculos teóricos de estructura y de dinámica molecular para abordar detalles mecanísticos y de comportamiento de especies reactivas. El disulfano, HSSH , y su base conjugada hidrodisulfuro, HSS^- , fueron propuestos como intermediarios clave de la reacción de reducción de MbFe^{III} mediada por $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$. Cabe mencionar que el HSSH/HSS^- es considerado efector de la actividad de H_2S en ciertos tejidos.

En el Capítulo 3, usando soluciones de disulfuro disódico como reactivo, estudiamos la coordinación de HSSH/HSS⁻ a MbFe^{III}, y su posterior reducción a MbFe^{II}, de forma análoga a los estudios con H₂S/HS⁻. Caracterizamos espectroscópicamente la formación del complejo MbFe^{III}(SSH⁻), estimamos su constante cinética de formación, el pK_a del complejo MbFe^{III}(SSH⁻), y las constantes intrínsecas de reducción de ambas especies de la cupla HSSH/HSS⁻. Los estudios realizados con estas especies azufradas inorgánicas nos llevaron a realizar una evaluación por métodos teóricos de los valores de pK_a de HS[•] y HSSH, ya que la literatura presentaba valores dispersos y sus especiaciones resultaban de interés para el análisis. El Capítulo 3 incluye un estudio preliminar sobre la formación de sulfhemos, unos compuestos de coloración verde característicos de la putrefacción de carnes, que aparecían como interferentes en algunos seguimientos cinéticos.

En los Capítulos 2 y 3, generamos y discutimos distintas propuestas mecanísticas, puestas a prueba frente a los resultados de los estudios cinéticos de H₂S/HS⁻ y HSSH/HSS⁻, y simulaciones de ecuaciones diferenciales. Los mecanismos generales propuestos en cada caso son consistentes con las cinéticas medidas en condiciones anóxicas.

Por último y dado que la reacción de hemoproteínas con NO ha sido muy estudiada, y que con el presente trabajo de Tesis sumamos nuestra contribución sobre la reacción de compuesto hémicos con H₂S/HS⁻ (y HSSH/HSS⁻), nos resultó de interés explorar la reacción de compuestos hémicos con el tercer miembro de la tríada de gases endógenos, el CO. El Capítulo 4 incluye una propuesta mecanística para la reacción de CO en medio básico frente a hemina IX Fe^{III}, realizada en base a datos espectroscópicos y cinéticos reportados. Los resultados apuntan al requerimiento de dos centros metálicos para las carbonilaciones reductivas más rápidas – o mejor, menos lentas – reportadas.

En conjunto, los resultados presentados contribuyen a la descripción química de la interacción de los miembros de la tríada de moléculas pequeñas endógenas frente a un destino bioquímico común: el hierro hémico.

Palabras clave: sulfuro de hidrógeno, disulfano, mioglobina, mecanismos de reacción, química de coordinación.

Reactivity of hydrogen sulfide and related molecules towards myoglobin as a hemeprotein model.

Abstract:

Hydrogen sulfide, H_2S , is a molecule of increasing biological interest since the end of the 20th century, when its biosynthesis in mammals was reported. Since then, its functions and mechanisms of action have been the subject of active research. It is part of a triad of endogenous signalers, together with nitric oxide, NO , and carbon monoxide, CO . Hemeproteins are among the known biochemical targets for H_2S . The thesis work presented here focused on the study of the reaction of inorganic reactive sulfur species with ferric myoglobin, MbFe^{III} , as a model of hemeproteins, seeking to contribute to the description of chemical interactions of potential biological relevance.

Chapter 1 aims to present the state-of-art in general chemical properties and reactivity of inorganic sulfur compounds towards hemic compounds.

Chapter 2 deals with the study of the reactivity of H_2S and its hydrosulfide conjugate pair, HS^- , towards MbFe^{III} from a kinetic and mechanistic point of view. The reduction reaction of MbFe^{III} to MbFe^{II} mediated by anhydrous sodium sulfide solutions was studied under anaerobic conditions. The reduction follows an asymmetric sigmoidal kinetic trace, which reveals the existence of a complex autocatalytic mechanism. The analysis of each stage allowed us to estimate phenomenological kinetic parameters of the initiation and overall process, and to propose a reaction mechanism for the experimental conditions employed. The kinetic methods were complemented with spectroscopic analysis, evaluation of the presence of radicals, and chemical evaluation of intermediates and final products. In addition, theoretical structure and molecular dynamics calculations were used to address mechanistic and behavioral details of reactive species. Disulfane, HSSH , and its hydrodisulfide conjugate base, HSS^- , were proposed as key intermediates of the $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ mediated MbFe^{III} reduction reaction. It is worth mentioning that HSSH/HSS^- is considered to be effector of H_2S activity in certain tissues.

In Chapter 3, using disodium disulfide solutions as reagent, we studied the coordination of HSSH/HSS^- to MbFe^{III} , and its subsequent reduction to MbFe^{II} , analogously to the studies

with $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$. We spectroscopically characterized the formation of the $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ complex, estimated its formation kinetic constant, the pK_a of the $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ complex, and the intrinsic reduction constants of both species of the HSSH/HSS^- couple. The studies performed with these inorganic sulfur species led us to perform an evaluation by theoretical methods of the pK_a values of HS^- and HSSH , since the literature presented scattered values and their speciations were of interest for the analysis. Chapter 3 includes a preliminary study on the formation of sulfhemes, green-colored compounds characteristic of meat putrefaction, which appeared as interferents in some kinetic follow-ups.

In Chapters 2 and 3, we generate and discuss different mechanistic proposals, tested against the results of $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ and HSSH/HSS^- kinetic studies, and differential equation simulations. The general mechanisms proposed in each case are consistent with the kinetics measured under anaerobic conditions.

Finally, and given that the reaction of hemoproteins with NO has been extensively studied, and that with the present Thesis work we add our contribution on the reaction of heme compounds with $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ (and HSSH/HSS^-), it was of interest to us to explore the reaction of heme compounds with the third member of the endogenous gas triad, CO. Chapter 4 includes a mechanistic proposal for the reaction of CO in basic medium against hemin IX Fe^{III} , carried out on the basis of reported spectroscopic and kinetic data. The results point to the requirement of two metal centers for the faster – or better, slower – reductive carbonylations reported.

Taken together, the results presented contribute to the chemical description of the interaction of the members of the endogenous small molecule triad against a common biochemical fate: heme iron.

Keywords: Hydrogen sulfide, disulfane, myoglobin reaction mechanism, coordination chemistry.

Agradecimientos

El Doctorado es una meta que lleva el nombre de una persona, pero está claro que nadie recorre este arduo y fructífero camino en soledad. Tengo mucho que agradecer por lo vivido y aprendido en este tiempo. Las siguientes líneas son un reconocimiento más que necesario a todas las personas que desde el ámbito académico, profesional o personal, formaron parte de este viaje.

En primer lugar, agradecer a mi familia, que lo sostiene todo. Sin Sandra como compañera de vida, constantemente empujándome a perseguir mis metas, y apoyando cada paso de este camino, probablemente no estaría escribiendo esto. Siempre voy a decir lo mismo, nos apoyaremos mutuamente y creceremos juntos. Esta Tesis es la prueba de eso. Olivia y Dimitri, mis hijos, son faros y cables a tierra, que hasta me han acompañado haciendo dibujos o tareas mientras procesaba datos o preparaba pósters, que me acompañaban a la distancia durante reuniones científicas.

A mis padres, Estela y Walter, y a mi hermana Nadia. También Patricia, Jorge, y toda la familia que también me adoptó. Ustedes lo dieron todo desde el primer día, ayudándome en todo cuanto pudieron y mostrando interés en lo que hacía, aunque no se me entendiera todo. El apoyo en pequeñas cosas todos los días, es enorme al final del recorrido. Gracias infinitas.

A mi Directora, la Dra. Sara Bari, prácticamente mi madre científica, desde 2012 cuando tímidamente fui de mano de un compañero a conocer un laboratorio de investigación. Tengo mucho que agradecer, no sólo lo académico sino lo personal. Me enseñaste no solamente a hacer ciencia, sino a hacerla con ética, con principios. Sos de esas directoras que se paran al lado del tesista a *hacer*, y en ese proceso me diste una visión de la ciencia que voy a inculcarle a cuanta persona pueda: nosotros no “descubrimos” cosas. No son verdades reveladas. Nosotros lo que hacemos es *aprender*. Aprendemos en equipo, aprendemos con otros, compartimos preguntas, compartimos logros, y construimos la ciencia desde esos lugares. Me enseñaste el *valor de la pregunta*. Vos y yo sabemos que lo diste más que todo, siempre presente, acompañando, aconsejando, gracias por todo.

Al Dr. Darío Estrin, fundamental en mi formación no sólo científica sino docente, habiendo compartido clases y discutido tanto de ciencia como de educación. Gracias por enseñarme junto con Sara y la Dra. Luciana Capece lo rico y complementario que tiene la química computacional. Espero poder aprender mucho más en ese campo en el futuro. En este punto es menester agradecer a las personas del Grupo de Modelado Molecular de INQUIMAE que estuvieron involucradas en enseñarme, y en hacer parte de los cálculos computacionales de esta Tesis.

A la Lic. Melisa Carllinni, el Lic. Jonathan Córdova y el Dr. Jonathan Semelak, compañeros muy valiosos sobre todo en el último tiempo, con quienes hemos compartido ciencia y aprendizajes de todo tipo. Sin duda tres excelentes personas y profesionales que cualquiera quisiera tener de compañeros.

Al Dr. Fernando Boubeta, por las discusiones mecanísticas que han sido de gran utilidad, el acompañamiento cuando fuimos a medir a Santa Fe; las ideas experimentales que aportaste significaron párrafos en este escrito.

A la Dra. Magalí Scocozza y al Dr. Daniel Murgida, del Laboratorio de Espectroscopía Raman de INQUIMAE, por compartir con nosotros su experiencia y experticia, las ricas discusiones y el trabajo compartido, necesario para contestar preguntas clave.

A los Dres. Carlos Brondino y Pablo González, de la Universidad Nacional del Litoral, por abrirnos las puertas de su laboratorio, las discusiones sobre atrapamiento de radicales y la sugerencia de usar PBN que, como leerán más abajo, fue fundamental para el desarrollo teórico propuesto.

A mis docentes, a todos ellos y ellas. Conozco bien la dedicación y el esfuerzo, la preocupación por la mejora continua. Contagian la pasión por aprender ciencia y ponerla en práctica, aún en contextos adversos, siempre buscando soluciones para que las cosas funcionen.

Al INQUIMAE y al CONICET, que me han dado un lugar donde trabajar y los recursos necesarios para hacerlo de la mejor manera. A los becarios con quienes compartimos espacios de trabajo, por contribuir al buen clima, siempre con respeto y actitud positiva. A

los investigadores que en charlas de pasillo nos recuerdan que nuestra tarea es tan humana como cualquier otra. A las personas que hacen a la administración, siempre con claridad y atención. Entre todos me brindaron un clima para trabajar que le recomendaría a cualquier becario.

A la Universidad de Buenos Aires, en particular a Exactas, que me ha brindado un lugar de formación académica pero también personal. Es para mí un orgullo haber pasado por este lugar y haber aprendido todo lo que aprendí. La educación pública, gratuita y de calidad me lo dio todo. Esta Tesis es parte de los frutos de tanta dedicación, de muchas personas que formaron parte de mi camino hasta acá.

Como escribí al principio, esta Tesis llevará mi nombre, pero en verdad lleva muchos nombres más. Y no es para mí, es para mi Patria, que me ha dado recursos y me ha dado la oportunidad de cumplir esta meta tan importante.

Que viva la Educación pública y la Ciencia argentina.

Gracias a todos los que formaron parte de esta historia.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 El azufre y su bioquímica.....	1
1.1.1 El sulfuro de hidrógeno	3
1.1.2 Disulfano y la serie de polisulfanos	13
1.1.3 Radicales inorgánicos azufrados	19
1.1.4 Diagrama de Frost de RSS inorgánicas en anoxia.....	24
1.2 Fuentes y métodos de detección de RSS inorgánicas	27
1.2.1 Fuentes de sulfuro y disulfano para el trabajo en el laboratorio.....	27
1.2.2 Detección espectroscópica de sulfuro y disulfuro por espectroscopía UV-Visible	28
1.2.3 Métodos analíticos para la cuantificación de RSS inorgánicas.....	28
1.2.4 Derivatización con alquilantes y análisis de los derivados.....	32
1.3 Destinos bioquímicos de las especies H_2S_n	34
1.3.1 Tioles de proteínas y biotioles.....	34
1.3.2 CO y NO, diálogo químico.....	35
1.3.3 La mioglobina como globina modelo	36
1.4 Antecedentes de interacción entre hemoproteínas y H_2S	40
1.4.1 Formación y estabilidad de complejos con H_2S	40
1.4.2 Reactividad química de los complejos de HPs y H_2S	50
1.4.3 Relevancia biológica de las interacciones de hemoproteínas con H_2S	53
1.4.4 Reacción de sulfuros sobre el anillo porfirínico: formación de sulfhemos	54
1.5 Reactividad de HSSH frente a hemoproteínas	56
1.6 Objetivos	58
2. La reducción de $MbFe^{III}$ mediada por sulfuro en condiciones anóxicas	59
2.1 Cinética de la reacción entre $MbFe^{III}$ y Na_2S	60
2.1.1 Cinética sigmoidea: hipótesis de autocatálisis.....	64
2.1.2 Dependencia de la velocidad de reducción de $MbFe^{III}$ respecto de $[H_2S]$	70
2.1.3 Dependencia de la reducción de $MbFe^{III}$ con sulfuro con el pH. Rol de la especiación del sulfuro	74
2.2 Intermediarios de reacción	78
2.2.1 Evaluación computacional de las constantes de acidez de HSSH y $HS^{\bullet}$	79

2.2.2 Estabilidad de $\text{HSSH}^{\bullet-} / \text{HSS}^{\bullet 2-}$	82
2.2.3 Captura de radicales intermediarios en la reducción de MbFe^{III} por H_2S	87
2.2.4 Evaluación teórica de la polaridad/selectividad de los atrapantes de radicales	92
2.2.5 Residencia de $\text{HS}^{\bullet}$ en la matriz proteica	94
2.2.6 El hidrodисульфuro, HSS^- , como intermediario de la reducción de MbFe^{III} por sulfuro	99
2.2.7 Evaluación teórica del sinergismo entre HS^- y HSS^- : hipótesis de trans-S-sulfuración	101
2.2.8 Presencia de polisulfuros como productos azufrados finales	107
2.3 Mecanismo de reducción de MbFe^{III} mediada por Sulfuro	110
2.3.1 Propuesta mecanística de la reducción autocatalítica de MbFe^{III} mediada por H_2S	110
2.3.2 Simulación del mecanismo de reacción de MbFe^{III} por sulfuro	119
2.4 Conclusiones	122
2.5 Materiales y métodos	123
2.5.1 Experimentales	123
2.5.2 Computacionales	127
3. La reducción de MbFe^{III} mediada por disulfuro en condiciones anóxicas.	129
3.1 Coordinación de HSS^- a MbFe^{III}	134
3.1.1 Determinación de la constante de unión, k_{on} , por flujo detenido	134
3.1.2 Dependencia de la constante de unión k_{on} con el pH	137
3.2 Reducción de MbFe^{III} por HSS^-	139
3.2.1 Dependencia de la constante cinética de reducción de MbFe^{III} con $R_{\text{SS/Fe}}$	139
3.2.2 Dependencia de la constante cinética de reducción de MbFe^{III} con el pH	141
3.2.3 Reducción de MbFe^{III} por HSS^- en presencia de atrapantes de radicales	144
3.3 Mecanismo de reducción de MbFe^{III} mediada por disulfano	145
3.3.1 Simulación de sistemas cinéticos mediante ecuaciones diferenciales. Estimación de constantes cinéticas	147
3.4 Interferencia del O_2 : formación de sulfmioglobina ferrosa	148
3.5 Conclusiones	158
3.6 Materiales y métodos	160
4. Carbonilación reductiva: propuesta mecanística	164
4.1 Análisis de la carbonilación reductiva de hemina IX ($\text{HIXFe}^{\text{III}}$) en medio alcalino	165
4.2 Análisis y simulación de propuestas mecanísticas de reducción de $\text{HIXFe}^{\text{III}}$ asistida por CO	169
4.3 Conclusiones	173

5. Conclusiones generales.....	175
6. Publicaciones.....	178
7. Referencias.....	179

1. Introducción

1.1 El azufre y su bioquímica

La bioquímica involucrada en el desarrollo de los seres vivos depende de las condiciones del entorno geoquímico, y la vida se desarrolla en un contexto planetario que no siempre fue como en la actualidad.¹ Las reconstrucciones filogenéticas de la fisiología del ancestro LUCA se sostienen en reacciones propias de la geoquímica, que provee los sustratos desde el entorno.² Teniendo en cuenta que el Gran Evento Oxidativo (GOE, *Great Oxidation Event*) se produjo hace 2500 millones de años, se especula que el metabolismo de todos estos organismos antiguos estuvo basado en el azufre.³ Luego del GOE, la atmósfera y los océanos se enriquecieron en oxígeno. Con la evolución de los organismos más arcaicos aparecieron especies cuyo metabolismo se sirvió del oxígeno. En la actualidad, la vida en la Tierra es predominantemente aeróbica, con un metabolismo que toma al oxígeno como participante necesario de la respiración celular. El átomo de oxígeno constituye aproximadamente el 65% en peso del cuerpo humano, y el azufre es un elemento secundario que está presente en un 0.3% en peso. No obstante, el azufre no perdió su importancia biológica ya que se encuentra en aminoácidos y en otras especies orgánicas o inorgánicas de relevancia bioquímica. De hecho, aunque el rol de las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) en organismos aeróbicos está sobradamente acreditado, ha sido sugerido que algunos de sus roles bioquímicos podrían ser asignados a especies reactivas del azufre (RSS, *reactive sulfur species*), apuntando a no asignar de antemano funciones químicas, metabólicas o de señalización a las ROS sin contemplar también la posibilidad de participación de RSS.⁴ No obstante, el término RSS es difícil de definir y de hecho su definición ha ido cambiando a lo largo de los años y los avances en el conocimiento sobre las especies azufradas de relevancia biológica. De hecho, el concepto se ha diversificado dependiendo del área del conocimiento. Aquí nos referiremos especialmente a especies de azufre inorgánicas, tanto radicalarias como no radicalarias, capaces de participar en los procesos bioquímicos de interés.

El azufre participa en una serie de reacciones rédox vitales y de procesos de transferencia átomos de S. La capacidad de concatenarse, formar compuestos oxigenados,⁵ y la flexibilidad de sus estados de oxidación permite un tipo especial e igualmente complejo de comportamiento rédox biológico en activa investigación.⁶⁻¹²

El estado de oxidación más alto alcanzable por el azufre es +6, presente en los sulfatos, y el más bajo es -2, presente en el sulfuro de hidrógeno y en los tioles. A este amplio abanico de estados de oxidación se agrega que los enlaces S-S son en general promiscuos, fáciles de romper y volver a formar. Para coronar la complejidad de este elemento, además de una química rédox muy rica, las especies inorgánicas y orgánicas de azufre a menudo presentan constantes de acidez moderadas que permiten la coexistencia de pares conjugados a valores de pH biológicamente relevantes. Por esto, en medio biológico podemos encontrar una serie de compuestos azufrados muy diversos, tanto orgánicos como inorgánicos (figura 1.1).

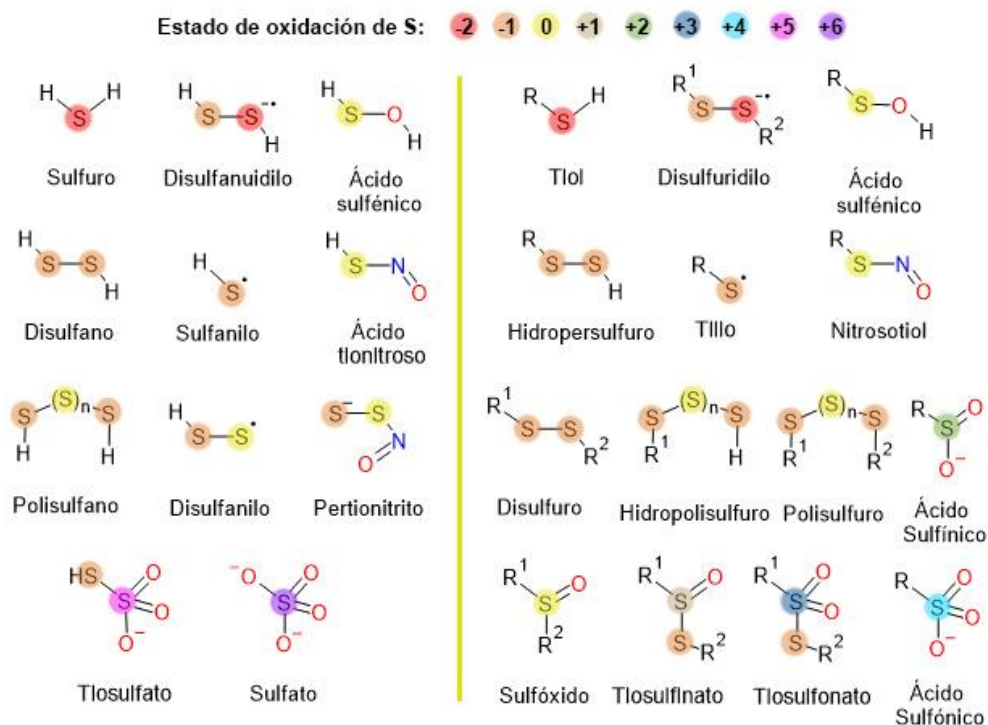


Figura 1.1. Especies de azufre inorgánicas (izquierda) y orgánicas (derecha) de interés bioquímico. El código de colores muestra el estado de oxidación de los átomos de azufre. Adaptado de Mishanina et al. (2015).¹³

Entre las especies orgánicas destacan los grupos tiol, que son fundamentales en muchos aspectos del metabolismo ya que se oxidan y vuelven a reducir con facilidad, lo que los convierte en importantes reguladores redox. Dos tioles muy importantes en bioquímica son la cisteína y el glutatión, que son biotioles de bajo peso molecular, extensamente estudiados.¹⁴⁻¹⁶ Además, son de relevancia los tioles de proteínas, que en muchos casos participan de la formación o escisión de puentes disulfuro, modificando la estructura terciaria y función de enzimas.^{12,17} En condiciones oxidativas juegan un papel importante las RSS derivadas de los tioles, especialmente los persulfuros y los disulfuros orgánicos.¹⁸

En relación con los compuestos inorgánicos con azufre, cabe mencionar al sulfuro de hidrógeno (H_2S), los polisulfanos (HS_nSH), las bases conjugadas correspondientes, hidrosulfuro, (HS^-), y polisulfuros, (HSS_n^-), y también los dianiones. Luego, se destacan especies mixtas como el tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), el sulfato (SO_4^{2-}), ácido tionitoso (HSNO), pertionitrito (SSNO^-), ácido sulfénico (HSOH), y especies radicalarias como el sulfanilo ($\text{HS}^\bullet$) y el disulfanuidilo ($\text{HSSH}^{\bullet-}$).^{19,20}

En la presente Tesis el trabajo experimental fue principalmente anóxico. Las especies de mayor interés son H_2S y el disulfano, HSSH , así como sus bases conjugadas hidrosulfuro e hidrodisulfuro, HS^- y HSS^- . También son relevantes los radicales azufrados derivados de las reacciones redox de estas especies, $\text{HS}^\bullet$, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y el disulfanilo, $\text{HSS}^\bullet$.

1.1.1 El sulfuro de hidrógeno

El H_2S es una molécula pequeña ($\text{PM} = 34 \text{ g/mol}$), gaseosa a temperatura ambiente y altamente soluble en agua. El H_2S es un agente reductor y también un ácido débil, por lo cual tanto la química redox como ácido-base son relevantes en su estudio.

En comparación con el agua, H_2O , el H_2S tiene puentes de hidrógeno más débiles debido a la menor diferencia de electronegatividad entre S y H ($\Delta\chi^p = 0.4$), que la diferencia entre O y H ($\Delta\chi^p = 1.4$). Esta diferencia es importante a la hora de considerar comparaciones en las interacciones intermoleculares con hemoproteínas, sobre todo en entornos donde los aminoácidos circundantes tengan grupos funcionales donores o aceptores de puentes de hidrógeno orientados hacia el sitio activo. Los puentes de hidrógeno que puede establecer

H₂S son significativamente más débiles. En comparación se ha reportado que H₂S es mejor donador que aceptor de puente de hidrógeno frente a metanol.²¹ Una característica resultante es que el estado de agregación a temperatura ambiente del H₂S es gaseoso, con un punto de ebullición normal de -60°C, a diferencia del agua que es líquida.

Comportamiento ácido-base

Los equilibrios ácido-base se presentan en las reacciones 1.1 y 1.2:



Los valores experimentales de pK_{a1} en la literatura se encuentran entre 6.96 y 7.07 (tabla 1.1). A la fecha, los valores aceptados son pK_{a1} = 6.98 a 25°C y 6.76 a 37°C,^{17,22,23} por lo que H₂S y HS⁻ coexisten a pH fisiológico.

pK _{a1}	Autores, cita	Año	Metodología
7.06	Loy and Himmelblau ²⁴	1961	Conductividad iónica en solución
7.05	Kubli ²⁵	1946	Titulación volumétrica, pH-metro
7.05	Su et al. ²⁶	1997	Potenciometría con electrodo Ag ₂ S
7.04	Bruner and Zawadzki ²⁷	1910	Gravimetría de sólidos y titulación de concentraciones de equilibrio
7.02	Ellis and Golding ²⁸	1959	UV-Vis de HS ⁻ en un rango amplio de pH
7.00	Ellis and Giggenbach ²⁹	1971	UV-Vis de Na ₂ S en NaOH concentrado
6.99	Konopik and Leberl ³⁰	1949	Colorimetría en función del pH
6.98	Goldhaber and Kaplan ³¹	1975	UV-Vis de HS ⁻ en soluciones de Cl ⁻
6.97	Wright and Maass ³²	1932	Presión de vapor de H ₂ O en función de [H ₂ S] y temperatura
6.97	Kapustinskii ³³	1940	Solubilidad de sulfuros metálicos en agua

Tabla 1.1. Valores reportados de pK_{a1} de H₂S, en orden decreciente.

Los valores de pK_{a2} reportados van desde 12 hasta 19. La Tabla 1.2 muestra una serie de valores reportados, con la metodología empleada y el año de publicación. En algunas fuentes, el valor reportado resulta de una estimación en base a datos experimentales de otros trabajos.

Uno de los inconvenientes que señalan los trabajos más recientes, sobre todo en métodos espectroscópicos, es la presencia de polisulfuros como contaminantes de las muestras. Pese

a la dispersión de los datos, a la fecha hay relativamente un consenso acerca de que el valor de pK_{a2} debería ser igual o mayor a 17,^{17,34} considerando los datos de espectroscopía UV-Vis,^{29,35} Raman,³⁶ y la revisión bibliográfica combinada con teoría de los ácidos débiles.³⁷ Con esto, la especie S^{2-} resultaría minoritaria incluso a pH muy alcalino.

pK_{a2}	Autores, cita	Año	Metodología
19.00	Myers ³⁷	1986	Revisión de literatura previa y tendencias periódicas
18.50	Schoonen y Barnes ³⁸	1988	Extrapolación a partir de acidez de polisulfuros
17.30	Peramunage et al. ³⁹	1994	UV-Vis de Na_2S concentrado
17.30	Meyer et al. ³⁶	1983	Raman de Na_2S en $NaOH$ concentrado
17.10	Giggenbach ³⁵	1971	UV-Vis de Na_2S en medio alcalino
17.00	Ellis y Giggenbach ²⁹	1971	UV-Vis de Na_2S en $NaOH$ concentrado
16.00	Licht et al. ⁴⁰	1990	Densitometría de soluciones saturadas de KSH en KOH
14.92	Knox ⁴¹	1908	Fuerza electromotriz entre HgS y Na_2S
14.15	Widmer y Schwarzenbach ⁴²	1964	Potenciometría
14.00	Ellis y Golding ²⁸	1959	UV-Vis de HS^- en un rango amplio de pH
14.00	Ellis y Milestone ⁴³	1967	UV-Vis de HS^- a distintas temperaturas (20°C a 90°C)
13.78	Maronny ⁴⁴	1959	Potenciometría
13.60	Goldhaber y Kaplan ³¹	1975	UV-Vis de HS^- en soluciones de Cl^-
13.10	Konopik y Leberl ³⁰	1949	Colorimetría en función del pH
12.44	Kubli ²⁵	1946	Titulación de $NaHS/Na_2S$ con HCl
12.00	Su et al. ²⁶	1997	Potenciometría con Ag_2S

Tabla 1.2. Valores reportados de pK_{a2} de H_2S , en orden decreciente.

En base a lo expuesto, en esta Tesis el término “sulfuro” referirá a la cupla ácido-base H_2S/HS^- , excepto que el medio se encuentre a más de dos unidades del pK_{a1} de H_2S y se considere despreciable alguna de las dos especies de la cupla.

Nucleofilia del sulfuro

En cuanto a su reactividad, la especiación juega un papel importante debido a que el H_2S y su base conjugada HS^- presentan una reactividad distinta. Esto es explicado experimental y teóricamente. Un punto clave es la comparación de sus niveles HOMO y LUMO dentro de la teoría de orbitales moleculares (figura 1.2). El valor de energía calculado para el LUMO del anión HS^- es de +8.015 eV e indica que el HS^- no puede ser un aceptor de electrones. Su

HOMO se calculó en -2.37 eV, consistente con el valor experimental -2.31 eV.⁴⁵ El HOMO del HS⁻ es menos estable que el del H₂S (-10.47 eV), lo que indica que el HS⁻ es más nucleofílico y básico que el H₂S, en acuerdo con la reactividad que muestra experimentalmente. El orbital HOMO para el H₂S tiene una energía de -9.646 eV, mientras que el valor experimental de los datos de energía de ionización es de -10.47 eV.⁴⁵ Por lo tanto, el H₂S no es un buen donador de electrones porque el HOMO es relativamente estable. El H₂S puede actuar como donador de electrones para átomos que tengan orbitales LUMO con energías más estables en comparación con el HOMO del H₂S u orbitales vacíos.

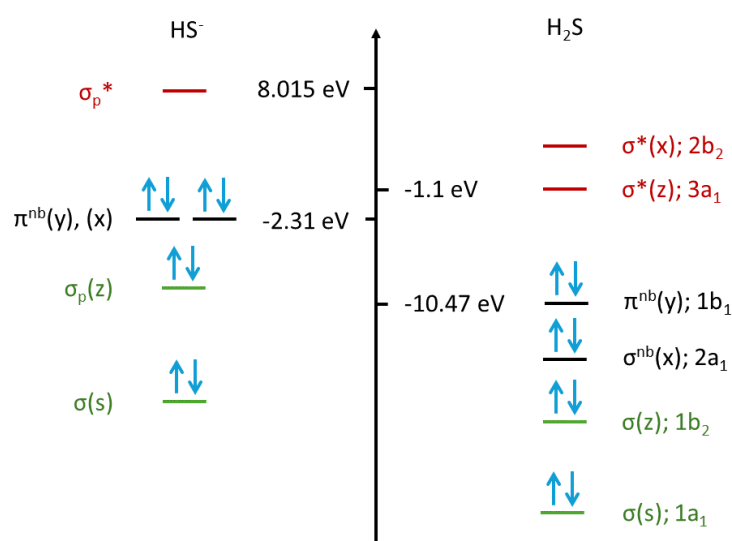


Figura 1.2. Orbitales moleculares de HS⁻ (izquierda) y H₂S (derecha). Adaptado de Rickard y Luther (2007).⁴⁶ Orbitales ligantes en verde, no ligantes en negro y antiligantes en rojo. Las energías indicadas en el eje central corresponden a la energía del HOMO y LUMO de cada especie.

En particular el anión HS⁻ es un buen nucleófilo teniendo en cuenta su capacidad de donar un par electrónico y formar enlaces covalentes. La carga negativa, la polarizabilidad del átomo de azufre y su electronegatividad relativamente baja juegan a favor del carácter nucleofílico de esta especie.⁴⁶

Química rédox

El sulfuro es capaz de participar en reacciones rédox de 1 o 2 electrones. En el caso de las reacciones de 2 electrones, el potencial de reducción E°'(HS₂⁻, H⁺ /2HS⁻) es -0.23 V,⁴⁷

indicando que es un buen reductor. Los valores para reacciones análogas de biotioles como glutatión y cisteína son similares.^{47,48} A nivel fisiológico, la reacción con peróxidos es relevante y da como producto el ácido sulfénico (HSOH), intermediario para la formación de polisulfanos, reacciones 1.3 y 1.4.⁴⁹



Las reacciones rédox por un electrón son importantes en la reactividad frente a complejos con metales de transición. El potencial $E^\circ(\text{S}^{\bullet-}, \text{H}^+ / \text{HS}^-)$ es +0.91 V, estimado a partir de parámetros termodinámicos de $\text{S}^{\bullet-}$ y HS^- .⁴⁸ El valor experimental es de +0.92 V.⁵⁰

La oxidación por un electrón del sulfuro a radical sulfanilo ($\text{HS}^\bullet$) mediada por oxidantes biológicos es energéticamente costosa, dado el alto potencial de reducción del par $\text{S}^{\bullet-}/\text{HS}^-$. Sin embargo, se sabe que el H_2S es capaz de reaccionar con O_2 y que también es oxidado por metales.²³ La discrepancia puede ser explicada por la alta reactividad del par $\text{HS}^\bullet/\text{S}^{\bullet-}$ resultante. De hecho, la autooxidación del sulfuro (reacción 1.5) ocurre pese a que el potencial es desfavorable, teniendo en cuenta el potencial $E^\circ(\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}) = -0.18 \text{ V}$ (-0.35 V para O_2 en fase gaseosa).⁴⁸



Lo que sucede es que la reacción presenta una cinética lenta, que puede atribuirse a que es prohibida por espín, lo cual le impone una barrera energética. El O_2 en su estado fundamental es triplete, de carácter dirradical. Eso le permite reaccionar favorablemente con especies químicas que tengan electrones desapareados, mientras que con especies de capa cerrada como H_2S la tendencia es la opuesta.

La autooxidación de sulfuro es compleja, dando lugar a una serie de intermediarios poco estables y generando productos como S_8 , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} (reacciones 1.6 a 1.9).





Los iones metálicos pueden actuar como catalizadores de estos procesos, al bajar la barrera de activación de reacciones redox.⁵¹ Algunas metaloproteínas como los citocromos, que contienen Cu^{II} y/o Fe^{III} como aceptores de electrones, actúan como catalizadores de la oxidación de azufre en condiciones aeróbicas (reacciones 1.10 y 1.11).



Este comportamiento justifica el uso de quelantes de iones metálicos en soluciones de sulfuro y el trabajo en anoxia para controlar su descomposición oxidativa.

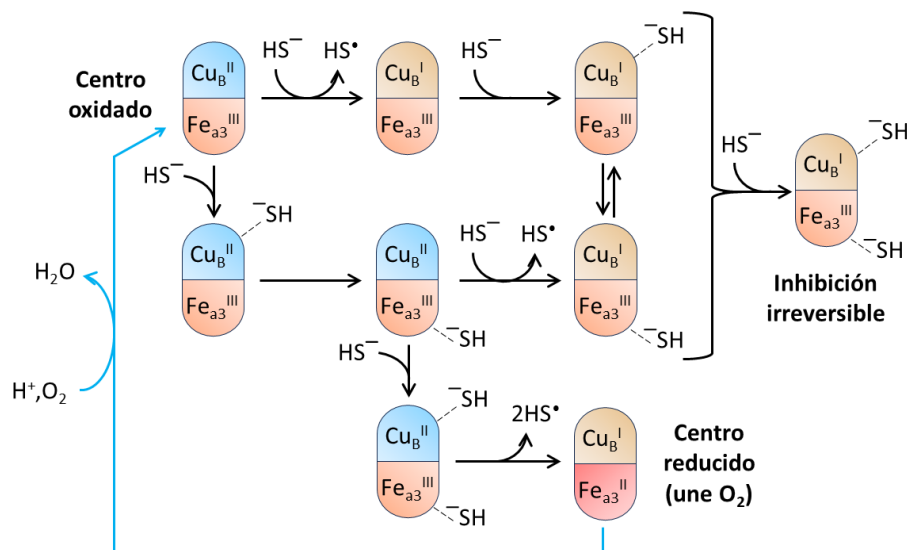
El sulfuro es un tóxico y también un señalizador endógeno

En relación con el medio biológico, el sulfuro históricamente ha sido señalado como una sustancia tóxica, cuya toxicidad es comparable a la del cianuro de hidrógeno, HCN. Fue descubierto como un gas tóxico en 1713 por el médico italiano Bernardino Ramazzini, dedicado a la salud ocupacional.⁵²

El mecanismo principal de toxicidad del H_2S involucra la inhibición irreversible de la enzima citocromo c oxidasa (CcO), participante fundamental de la cadena respiratoria mitocondrial ya que cataliza la reducción de O_2 a H_2O .

La CcO es una proteína compleja con varias subunidades. Posee dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) y dos grupos hemo de hierro (notados como Fe_a y $\text{Fe}_{3\text{a}}$). Ha sido reportada la reacción de CcO oxidada, es decir, con los átomos de hierro y cobre en estado de oxidación +3 y +2 respectivamente ($\text{Cu}_\text{A}^{\text{II}} \text{Fe}_\text{a}^{\text{III}} \text{Fe}_{3\text{a}}^{\text{III}} \text{Cu}_\text{B}^{\text{II}}$), en presencia de exceso de sulfuro en condiciones aeróbicas.⁵³ Los resultados revelaron que el sulfuro reduce inicialmente los centros $\text{Fe}_\text{a}^{\text{III}}$, $\text{Cu}_\text{A}^{\text{II}}$ y $\text{Cu}_\text{B}^{\text{II}}$.⁵³ En el esquema 1.1 se presentan mecanismos sugeridos para cada condición experimental. La inhibición completa de la CcO requiere 3 moles de H_2S por mol de enzima, que producen la reducción de $\text{Cu}_\text{B}^{\text{II}}$ a $\text{Cu}_\text{B}^{\text{I}}$, la coordinación a $\text{Cu}_\text{B}^{\text{II}}$ y la coordinación a $\text{Fe}_{3\text{a}}^{\text{III}}$. El producto de inhibición es de la forma $(\text{HS}^-)\text{Cu}_\text{B}^{\text{I}}\text{Fe}_{3\text{a}}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.⁵⁴ Por otro lado, la inhibición parcial tiene efectos de señalización endógena, con un aumento de la Q_{10} reducida.

Por el contrario, a niveles bajos de sulfuro, la CcO no se inhibe. H_2S actúa como reductor de ambos centros metálicos. Ha sido propuesto que en esas condiciones, el sulfuro podría recuperar el estado reducido de la CcO, $\text{Cu}_B^{\text{I}}\text{Fe}_{a3}^{\text{II}}$, que une un oxígeno en la cadena respiratoria,⁵³ tal como lo hace canónicamente el citocromo c. Cabe mencionar que el rol principal del sulfuro es a nivel de la enzima SQOR, produciendo la reducción por dos electrones de la coenzima Q_{10} .



Esquema 1.1. Mecanismos propuestos para la interacción entre la enzima CcO y HS^- . La flecha celeste representa la reacción de la CcO con O_2 en la cadena respiratoria.

El ejemplo de la CcO pone de manifiesto que el H_2S no es meramente un tóxico, sino que su presencia en sistemas biológicos es necesaria en una determinada concentración basal. En las últimas décadas se han llevado adelante distintas investigaciones para dar con funciones fisiológicas, teniendo en cuenta su producción endógena. Está presente en animales, plantas y microorganismos, en concentraciones fisiológicas de orden de magnitud desde nanomolar a micromolar.^{13,55} Su déficit se asocia a algunas condiciones patológicas.⁵⁶ De hecho, se propone que intervenciones dietéticas y farmacológicas basadas en H_2S proveen beneficios para la salud y esperanza de vida,^{56,57} al mismo tiempo que se sabe que la exposición a niveles elevados tiene efectos tóxicos a letales.⁵⁸ Es decir que tanto el exceso como el defecto de H_2S son perjudiciales, y existe un rango de concentraciones de H_2S

normales en homeostasis.⁵⁹ Por esta razón, se considera que existe un intervalo hormético de concentración para el sulfuro (figura 1.3).⁵⁹

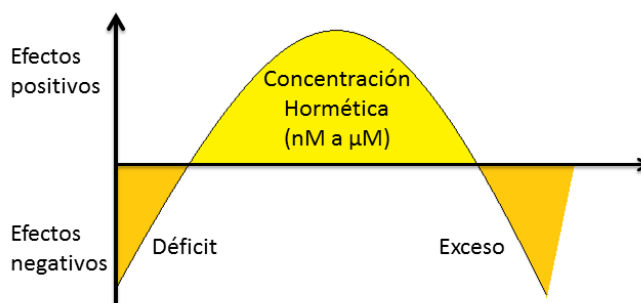


Figura 1.3. Gráfico esquemático del efecto hormético. La zona amarilla representa el intervalo de concentraciones de H₂S con efectos beneficiosos. Las áreas en naranja representan los intervalos de efectos adversos por defecto o por exceso de H₂S.

En la literatura el H₂S es incluido junto con el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) en una familia de compuestos denominados gasotransmisores.⁶⁰ El término “gasotransmisor” es controversial,⁴⁷ ya que en medio biológico se encuentran como solutos en fase líquida. Se trata de moléculas que comparten las siguientes propiedades: son moléculas pequeñas, gaseosas en CNPT, endógenas, con metabolismo regulado, y con un rol biológico definido a concentraciones bajas, pero tóxicas en concentraciones elevadas. A las tres se les atribuyen efectos de hormesis en distintos aspectos como regeneración tisular, regulación en sistema nervioso central y cardiovascular, y homeostasis redox.^{56,61–64} Poseen distintas funciones de señalización endógena.^{17,65,66} En este sentido, estas moléculas pueden atravesar la membrana plasmática para pasar el mensaje directamente a un objetivo bioquímico intracelular. Además, han sido reportadas interacciones entre sus vías metabólicas;^{10,60,67,68} este conjunto de especies comparten destinos bioquímicos y participan de diálogo químico ya sea en su forma libre o sobre plataformas como el grupo hemo de hemoproteínas.⁶⁰ El diálogo químico frente a una misma diana puede dar origen a otras especies reactivas, o generar competencia entre los gasotransmisores.

Biosíntesis, catabolismo, concentraciones endógenas y funciones del sulfuro endógeno

La biosíntesis, el catabolismo, la determinación de concentraciones endógenas, y las posibles funciones del sulfuro son objeto de estudio y revisión continua.^{12,69}

A la fecha han sido identificadas varias rutas de producción enzimática de sulfuro endógeno. Las primeras que fueron reportadas fueron la cistationina beta sintasa (CBS, *cystathionine β -synthase*), la cistationina gamma liasa (CSE, *cystathionine γ -lyase*) y la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST, *3-mercaptopyruvate sulfurtransferase*).⁷⁰

La CBS y CSE utilizan el azufre de la homocisteína y L-cisteína respectivamente a través de la vía de la trans-S-sulfuración. Ambas son consideradas generalmente como enzimas citosólicas, pero también pueden ser translocadas a la mitocondria por hipoxia u otros factores estresantes. Esto resultaría útil para la producción de sulfuro ya que en mitocondria las concentraciones de cisteína son tres veces superiores.^{71,72}

La 3-MST se une al 3-mercapto piruvato (3-MP) formando un 3-MST-persulfuro, del que se puede liberar H₂S mediante un reductor intracelular. Esta enzima se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias.

Además de estas tres vías, el H₂S también es producido en el citosol a partir de sulfuro de carbonilo (COS) por la anhidrasa carbónica (CA, *carbon anhydrase*),⁷³ en los peroxisomas por la catalasa y por la D-aminoácido oxidasa (DAAO, *D-aminoacid oxidase*) que cataliza la formación de 3-MP a partir de D-cisteína en los peroxisomas, que luego es transportada a la 3-MST mitocondrial.⁷⁴

En mitocondria, el S₂O₃²⁻ puede ser metabolizado por la enzima tiosulfato azufre transferasa (TST, *thiosulfate sulfur transferase*) o rodanasa (*rhodanese*), y la cisteína por la azufre transferasa 1 (ST1, *sulfur transferase 1*) presente en levaduras, generando H₂S en ambos casos.

Actualmente está en discusión la participación de la cisteinil-ARNt sintetasa (CARS, *cysteinyl-tRNA synthetase*) en la síntesis de RSS, sobre todo de persulfuros orgánicos y polisulfanos.⁷⁵ Los persulfuros pueden luego dar lugar a la formación de H₂S por acción de reductores endógenos, por ejemplo, el sistema tiorredoxina (Trx).

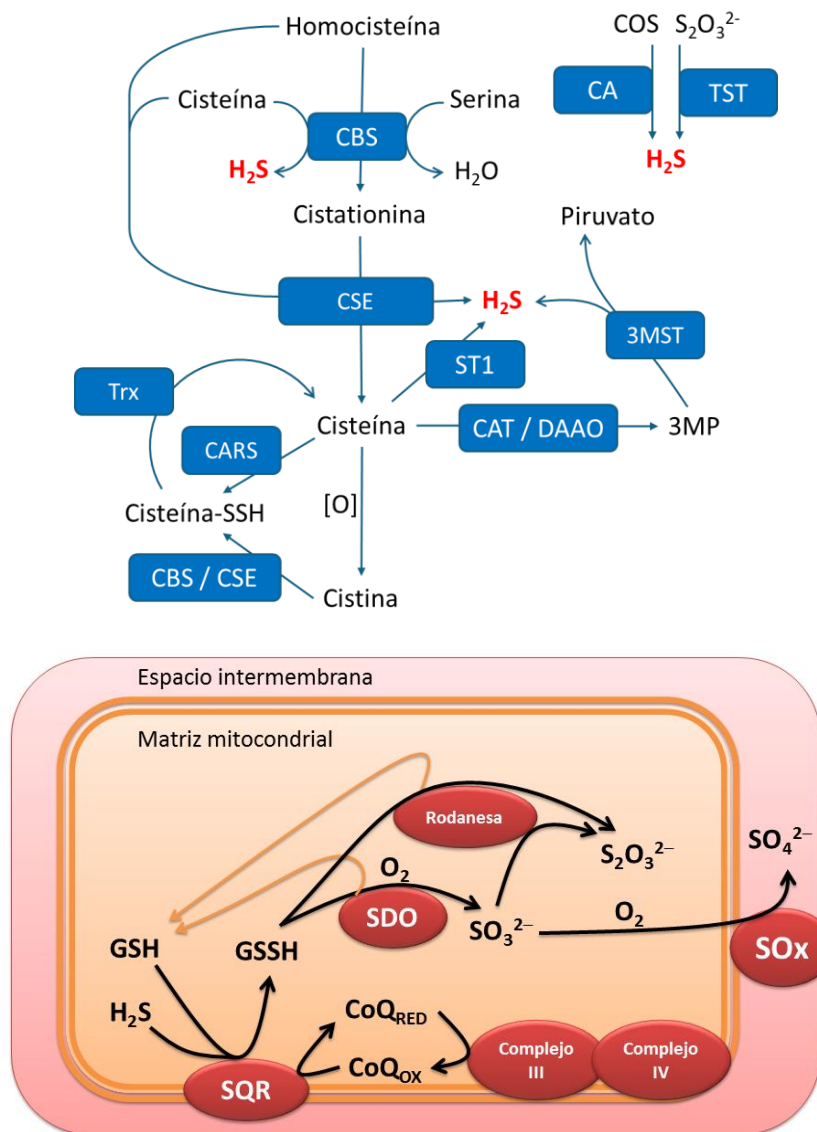


Figura 1.4. Biosíntesis (arriba) y catabolismo via sulfoquinona oxidoreductasa (abajo) de H_2S .

Con respecto a las vías catabólicas, la eliminación oxidativa de H_2S o HS^- es relevante para evitar los efectos tóxicos en altas concentraciones. Los procesos biológicamente relevantes tienen mezclas variables de sulfito (SO_3^{2-}), sulfato (SO_4^{2-}), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) y polisulfuros (HS_nSH , $n=2-7$) como productos finales solubles dependiendo del pH, la presencia de oxidantes y catalizadores. Por ejemplo, en el intestino humano las mitocondrias son capaces de tratar el H_2S producido por la flora entérica. Los enterocitos proveen electrones a la cadena de transporte de electrones mediante la oxidación aeróbica de H_2S , formando SO_4^{2-} y $S_2O_3^{2-}$.⁷⁶

La vía de oxidación del sulfuro mitocondrial de los mamíferos convierte el H_2S en SO_4^{2-} y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ como productos principales, mediante la actividad inicial de una sulfoquinona oxidorreductasa (SQOR, *sulfur-quinone oxidoreductase*), seguida de una azufre dioxigenasa o persulfuro dioxigenasa (SDO, *sulfur dioxygenase*), una azufre transferasa o rodanasa (*rhodanese*) y una sulfito oxidasa (SO, *sulfite oxidase*).⁷⁷⁻⁷⁹

Aunque los primeros estudios sobre H_2S endógeno indicaban que las concentraciones fisiológicas en diferentes tejidos se situaban en el intervalo de 30-100 μM , una revisión de los métodos analíticos, y el desarrollo de metodologías con mejor precisión y límites de detección, permitieron estimar que las concentraciones se sitúan en el intervalo de 4-55 nM para distintos tejidos.⁸⁰⁻⁸²

En concentraciones fisiológicas, han sido asignadas al sulfuro un amplio espectro de actividades biológicas, incluidas acciones antioxidantes y citoprotectoras, así como efectos vasodilatadores, antiinflamatorios y antifibróticos.^{7,12,67,83-85} Más aún, en la literatura existen propuestas de potenciales aplicaciones farmacológicas, que van desde el uso de H_2S hasta compuestos donores de H_2S .⁸⁶⁻⁸⁸

1.1.2 Disulfano y la serie de polisulfanos

El disulfano, HSSH , es el miembro más pequeño de la familia de los polisulfanos, HSS_nH .³⁴ El número n varía de acuerdo con los estados de protonación: mientras que para las especies dianiónicas SS_n^{2-} se aislaron y caracterizaron sales de distintos contraiones con $1 \leq n \leq 8$,⁸⁹ para los polisulfanos neutros HSS_nH el valor de n asciende a $1 \leq n \leq 24$.⁹⁰

Acidez de la serie de polisulfuros

La reactividad de muchas RSS depende de su estado de protonación, como hemos visto para el caso del sulfuro. La serie de HSS_nH y sus bases conjugadas han sido objeto de estudio de numerosos autores.^{34,47,91-96} Las técnicas empleadas incluyen titulaciones en flujo,⁹¹ análisis de derivados alquilados por HPLC/MS,⁹² y cálculos de energía libre.⁹⁶

En la tabla 1.3 se resumen valores reportados de pK_{a1} y pK_{a2} para HSS_nH ($n \leq 7$).

	pK _{a1}	pK _{a2}
H ₂ S ₂	2.6 ⁴⁷ 5.0 ⁹¹ 5.11 ^{34,92} 7.1 ⁹⁶	9.5 ⁹⁶ 9.7 ⁹¹ 10.03 ⁹² 13 ⁴⁷
H ₂ S ₃	4.2 ⁹¹ 4.31 ^{34,92} 7.3/7.6 7.9 ⁹⁶	7.83 ⁹² 9.3 ⁹⁶
H ₂ S ₄	3.8 ⁹¹ 3.91 ⁹² 7.0/7.5 ⁹⁶	6.3 ⁹¹ 6.63 ⁹² 8.6/9.4 ⁹⁶
H ₂ S ₅	3.5 ⁹¹ 3.61 ⁹²	5.7 ⁹¹ 6.03 ⁹²
H ₂ S ₆	3.58 ⁹²	5.51 ⁹²
H ₂ S ₇	3.48 ⁹²	5.18 ⁹²
H ₂ S ₈	3.40 ⁹²	4.94 ⁹²

Tabla 1.3. Valores de constante de acidez de literatura para sulfuro, polisulfanos HSS_nH (n≤7).

Los valores de pK_a que presentan todas estas especies marcan el predominio de distintos estados de protonación. Mientras que para sulfuro a pH fisiológico hay coexistencia de H₂S y HS⁻, para los polisulfuros superiores (5 ≤ n ≤ 7) la especie mayoritaria sería el dianión SS_n²⁻. No obstante, en esos casos los valores de pK_a reportados provienen de un único trabajo. En el caso de los polisulfuros más pequeños, se observa que en la literatura hay dispersión en los valores de pK_a. Los valores aceptados actualmente han sido reunidos en un trabajo de revisión.³⁴ Respecto de HSSH, tomando pK_{a1}(HSSH) = 5.11 y pK_{a2}(HSSH) = 10.03,³⁴ podemos considerar que la especie mayoritaria a 6≤pH≤8 es HSS⁻. En adelante, nos referiremos al disulfano como HSS⁻.

Para tener como referencia algunos medios del cuerpo humano, la sangre tiene un pH óptimo de 7.4, similar al espacio extracelular. Los líquidos intracelulares (citoplasma) abarcan valores de pH cercanos a 7.1. En músculo esquelético encontramos valores entre 7.14⁹⁷ y 6.0.⁹⁸ En mitocondrias el espacio intermembranas tiene un pH de 6.8 y la matriz interna de 7.7.⁹⁹ En líneas generales, podríamos considerar la ventana entre pH 6.0 y 8.0 para abarcar todo el intervalo conocido del medio interno.¹⁰⁰

Concatenación de S, longitud de cadena

Los polisulfuros pueden interconvertirse en escalas de tiempo de unos pocos segundos, en una serie de reacciones en equilibrio (reacciones 1.12 a 1.15).⁹⁵ Estos equilibrios en solución se observan independientemente de la sal disódica Na₂S_n (n = 2, 3, 4) utilizada, y son dependientes de la temperatura,⁹⁵ y el pH.³⁴ La rapidez con que se establece el equilibrio es un obstáculo para su identificación en solución.





La distribución de longitudes de cadena de átomos de azufre presenta mayores proporciones de especies dianiónicas SS_n^{2-} de mayor valor de n , a pH más ácidos.^{35,101} Esto quiere decir que a menor pH se favorece la concatenación de enlaces S-S. También ha sido reportado que a $\text{pH} < 7.0$ se puede observar la formación de azufre elemental (S_8) que se evidencia por la aparición de turbidez, ya que es insoluble en agua.¹⁰¹

Una explicación posible a este fenómeno es que los aniones de mayor n , en particular $n = 6, 7$ y 8 , pueden formar compuestos cíclicos. Estas especies S_7^{2-} , S_8^{2-} y S_9^{2-} en medio ácido (con pK_a s 5.5, 5.1 y 4.9, respectivamente) se protonan en uno de los extremos de la cadena.¹⁰¹ El extremo protonado de la cadena azufrada de una especie HSS_n^- es atacable por el extremo desprotonado, que actuaría como nucleófilo en una reacción intramolecular. Como producto de este ataque nucleofílico intramolecular, se puede producir una molécula de HS^- y un ciclo S_n neutro ($n = 6, 7, 8$; reacciones 1.16, 1.17 y 1.18).¹⁰¹ Desde el punto de vista cinético es favorable por ser una reacción intramolecular.



También ha sido reportado que en medio acuoso los ciclos S_6 y S_7 son particularmente inestables, y S_8 es la única especie elemental observada. En medio orgánico sólo un 1% del azufre elemental observado corresponde a S_6 y S_7 .¹⁰²

La baja solubilidad de S_8 se encuentra en el rango nM incluso a alta temperatura.¹⁰³ El alótropo S_8 ortorrómbico, también llamado $\alpha\text{-S}_8$ es el más estable en CNPT.^{104,105} La formación y crecimiento de las partículas puede entenderse como un proceso de maduración de Ostwald.¹⁰⁶ La velocidad de formación de partículas es mayor a menor pH.¹⁰⁵

Reactividad de los polisulfuros: nucleofilia y comportamiento redox

Para estudiar la reactividad de los polisulfuros es necesario considerar su especiación en términos de largo de cadena y estado de protonación. Los polisulfuros en general se presentan como aniones teniendo en cuenta su acidez creciente a mayores longitudes de cadena. La nucleofilia se asocia con el carácter básico de las especies involucradas, ambas propiedades explicadas en términos de la tendencia a donar electrones, con energías de HOMO mayores. En términos cualitativos, también puede ser mencionado el efecto alfa, de forma análoga a lo que se observa en persulfuros (RSSH/RSS⁻).^{14,107} Este considera un aumento de la nucleofilia causado por la presencia de un átomo adyacente con un par electrónico libre.¹⁰⁸ Si se compara el carácter reductor de HS⁻ y HSS⁻, por ejemplo, se observa que hay una diferencia significativa entre sus potenciales E°' (pH=7, reacciones 1.19 y 1.20).⁴⁷



La diferencia es de 0.64 V, lo cual los convierte en reductores de distinta potencia, siendo el HSS⁻ un reductor más potente. El potencial redox de los polisulfuros con HSS_n⁻ con n>1 es de difícil abordaje experimental debido a su interconversión rápida.

Biosíntesis, concentración endógena y funciones del disulfano y otros polisulfanos

Los polisulfanos y polisulfuros, HSS_nH/HSS_n⁻, son reactivos e inestables, y a pesar de esto existen como metabolitos endógenos. La homeostasis redox consiste en un balance entre las especies oxidadas HSSH, persulfuro de cisteína (Cys-SSH), persulfuro de glutatión (GSSH), y persulfuros de tioles proteicos, con sus formas reducidas H₂S, cisteína, glutatión, y tioles de proteínas en células en estado estacionario. Este balance puede perderse localmente en procesos de persulfidación, pero el estado estacionario se recupera luego de la acción de señalización. Aunque el ajuste de este balance no está completamente esclarecido, el tema es de activo interés en la literatura especializada.⁶⁹ Lo cierto es que H₂S reacciona con productos de oxidación de tioles, pero los polisulfanos y polisulfuros son capaces de reaccionar con tioles.

La bioquímica que involucra $\text{HSS}_n\text{H}/\text{HSS}_n^-$ está necesariamente ligada a la bioquímica del sulfuro y a las formas en que se generan estas RSS en medio biológico (sección 1.1.1).

Distintos H_2S_n han sido encontrados en cerebro.¹⁰⁹ Ha sido reportada su síntesis por medio de la enzima 3-MST usando $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ o 3-MP como sustratos.^{69,110–112} Más recientemente, aunque en discusión, ha sido reportada su producción por medio de la enzima CARS, que sería capaz de sintetizar persulfuros y polisulfuros de cisteína como precursores de H_2S_n .¹¹³ En ambos casos, las enzimas sintetizan persulfuros orgánicos (RSS_nH) que luego reaccionan con el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TR), que los reduce y libera polisulfuros inorgánicos como producto. Está en discusión la formación de H_2S_n de manera directa a partir de la reacción entre 3-MST persulfidada y H_2S , así como a partir de la persulfidación directa de otras especies (biotioles y tioles proteicos).¹¹⁴

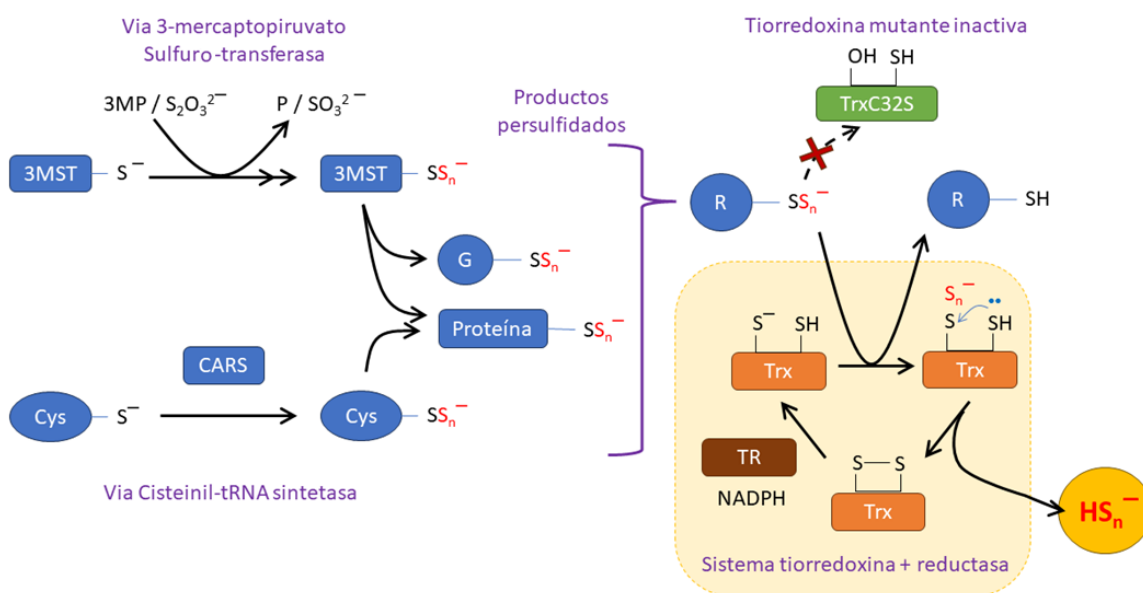


Figura 1.5. Mecanismos de síntesis endógena de polisulfuros inorgánicos.

En el sistema Trx/TR, la primera es una enzima llamada tiorredoxina (Trx, *thioredoxin*), que posee actividad reductora de persulfuros mediante dos residuos de cisteína que se encuentran próximos, y que al oxidarse forman un puente disulfuro. La tiorredoxina reductasa (TR, *thioredoxin reductase*), reduce la Trx recuperando su forma reducida con gasto de NADPH (figura 1.5). La participación de este sistema es clave más allá de las

enzimas 3-MST y CARS, debido a que ha sido observado experimentalmente que, al mutar la cisteína que se persulfida en la Trx (Cys³²) por una serina (-OH en lugar de -SH), se inhibe la producción de polisulfuros.¹¹⁵ Cabe mencionar que la Trx es capaz también de reducir los polisulfuros.

Alternativamente, H₂S₂ puede ser producido por reacción de H₂S y NO.^{116,117} En este mecanismo, NO es oxidado inicialmente a N₂O₃, que reacciona con H₂S para producir H₂S₂ y el producto de reducción por un electrón del NO llamado nitroxilo, HNO.

La biosíntesis de polisulfuros sigue en discusión y no está completamente esclarecido cuáles son todas las fuentes posibles ni cuáles son las más relevantes en términos de actividad bioquímica.

El polisulfano mayoritario en medio biológico es H₂S₃, seguido por HSSH y H₂S₅.¹¹⁸ Se pueden encontrar en el citosol, y la concentración basal reportada para H₂S₃ es de 3.4 nmol/g (0,7 μM) de proteína en cerebro, comparable con los 4.8 nmol/g (1 μM) determinados para H₂S.¹¹⁸ Para el caso de HSSH, han sido reportadas concentraciones endógenas del orden de 2.6 μM.¹¹⁹

Las especies H₂S₂ y H₂S₃ han sido señaladas como posibles efectores de la acción del sulfuro, debido a su mayor potencia frente a los mismos destinos bioquímicos en cerebro.^{109,112,120} Este resultado ha promovido una activa investigación en la química y bioquímica de polisulfanos.

Ha sido reconocida la participación de estos polisulfanos en la regulación de la actividad de la proteína supresora de tumores (PTEN, *phosphatase and tensin homolog*),¹²¹ inducción de ingreso de Ca²⁺ en astrocitos por persulfidación de cisteína en canales TRPA1 (*transient receptor potential ankyrin 1*),¹²² vasodilatación por medio de la formación de disulfuros de la proteína PKG1α (*protein kinase G1 α*),¹²³ y generación de RSS que cumplirían un rol de mantenimiento bioenergético en la cadena de transporte electrónico de la respiración celular.¹¹³ El canal TRPA1, conocido como el receptor del wasabi, es un sensor del dolor, el frío y la comezón en humanos, y también funciona como sensor de sustancias irritantes del medioambiente, estimulando respuestas protectoras como las lágrimas, o la tos.

Más recientemente, han sido descriptos otros casos en que el H₂S presenta efectos más potentes que los del HSSH. Aunque ambos regulan la liberación de neurotransmisores como GABA, glutamato y glicina, ha sido demostrado que el H₂S es 10 veces más potente que HSSH para la producción de GABA, en cierto sistema experimental. En casos como este ha sido considerado que el H₂S sería el efector preferencial en virtud de su mayor concentración.¹²⁴

Aunque el H₂S puede liberar neurotransmisores con más eficiencia que HSSH, se ha propuesto que H₂S y HSSH ejercen con similar potencia su efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo, a través del aumento de concentraciones intracelulares de glutatión.¹²⁵

También ha sido documentada la activación por soluciones de Na₂S₂ de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1, *indoleamine 2,3-dioxygenase*), una hemoproteína que tiene actividad inmunosupresora, mediando entonces procesos inflamatorios y respuestas autoinmunes.¹²⁶

1.1.3 Radicales inorgánicos azufrados

Los radicales azufrados se generan por reacciones de ruptura homolítica de polisulfuros, o bien por reacciones rédox por un electrón, siendo estas últimas las más descriptas en la literatura. El radical más sencillo que podemos encontrar es el radical sulfhidrilo o sulfanilo, HS•/S•⁻. Los radicales inorgánicos de azufre son especies con protones lábiles, y pueden participar de reacciones ácido-base. A partir de 2 átomos de azufre, podríamos hablar de dos tipos de radicales: los radicales tipo sulfanilo (HSS_n•) y los radicales tipo sulfanuidilo (HSS_nH•⁻).

Los más mencionados en la literatura son los radicales tipo sulfanilo que derivan de la oxidación por un electrón de un polisulfano o polisulfuro (reacción 1.21), o bien por ruptura homolítica (reacción 1.22).



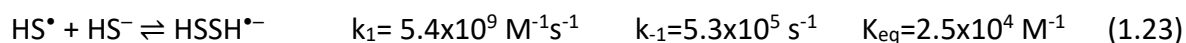
Estos radicales tienen la particularidad de que todos sus átomos de azufre tienen estado de oxidación 0, excepto uno de los terminales de la cadena cuando estos son lineales, que tiene estado -1 (esquema 1.2). Los radicales disulfanilo/disulfuro, $\text{HSS}^\bullet/\text{S}_2^{\bullet-}$, y el radical trisulfuro, $\text{S}_3^{\bullet-}$ son los miembros más pequeños de la familia de $\text{HSS}_n^\bullet$.



Esquema 1.2. Interconversión entre RSS radicalarias y no radicalarias. Las flechas dobles simbolizan procesos de homólisis o recombinación.

Los aniones radicales $\text{S}_2^{\bullet-}$ y $\text{S}_3^{\bullet-}$ han sido caracterizados por espectroscopía UV-Visible, Raman y EPR, tanto en solución como en estado sólido.^{127,128} El radical trisulfuro, de color azul intenso, ha sido encontrado en vestigios dentales de la antigüedad, que se corresponden con tiempos del uso de lapislázuli como pigmento.³⁴ Este mineral debe su color a la presencia de $\text{S}_3^{\bullet-}$, poniendo en evidencia su estabilidad en estructuras sólidas. Estas especies radicalarias son estables en medio orgánico. En medio acuoso su conversión a polisulfuros es muy favorable.³⁴

En cuanto a radicales sulfanuidilo sólo se conoce experimentalmente al miembro más pequeño, $\text{HSSH}^\bullet/\text{HSS}^{\bullet-}$, llamado disulfanuidilo o disulfanudi-idilo según su estado de protonación, respectivamente. Esta especie fue reportada en experimentos de fotólisis flash de soluciones concentradas de sulfuro, al observar bandas de absorción que no correspondían a $\text{HS}^\bullet$, de mayor intensidad a pH alcalino.^{50,129} La formación de $\text{HSSH}^\bullet/\text{HSS}^{\bullet-}$, puede ocurrir por combinación reversible de $\text{HS}^\bullet$ y HS^- (reacción 1.23),^{50,129} o bien por reducción de HSSH/HSS^- (reacción 1.24).⁴⁸



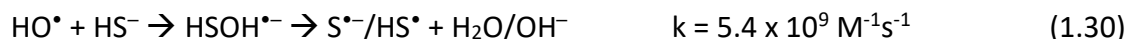
HS• y HSSH^{•-}: dos especies relacionadas

HS• es el radical inorgánico de azufre más sencillo. Se origina por oxidación de sulfuro o por ruptura homolítica de un enlace S-H. La ruptura homolítica ha sido realizada en distintos estudios mediante ultrasonido, radiación y o fotólisis (reacciones 1.25 a 1.27).^{50,129-131}



Los estudios de fotólisis incluyen la irradiación con un pulso láser de 193 nm, observando la aparición de una señal de absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240} = 1800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que fue asignada a HS•.¹²⁹ Esta señal decae en aproximadamente 40 µseg, y su generación es óptima en un rango de pH entre 3 y 4.⁵⁰ Ha sido propuesta, como alternativa a la ruptura homolítica, la separación de un electrón solvatado en medio alcalino, ya que se registró la aparición de su señal característica de absorción en 720 nm ($\epsilon_{720} = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).^{50,131}

Además, los cationes metálicos, M^{n+} , los radicales oxhidrilo, HO•, y nitrito, NO₂• pueden ser oxidantes por un electrón de H₂S. La velocidad de oxidación con radicales es difusional o cercana al límite difusional, conforme las reacciones 1.28 a 1.30.^{130,132}



El radical HS• es una de las RSS más reactivas, altamente oxidante.⁴⁷ Una evidencia de ello es el corto tiempo de vida media que posee, siendo capaz de dar numerosas reacciones de control difusional.^{50,129}

Los estudios de fotólisis reportan además la aparición rápida de una especie que absorbe a 380 nm, cuya absorptividad se estima entre $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,¹²⁹ y $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹³⁰ La intensidad de absorción de esa especie es baja en soluciones muy ácidas, y significativa en medio alcalino. Al observar que la formación de esta especie está favorecida tanto por el aumento del pH como por la concentración de sulfuro, distintos autores han propuesto que la especie formada es el radical anión disulfanuidilo, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ (reacción 1.23).^{50,129,130} En medio ácido ha sido sugerida la formación de un complejo mayor, $\text{H}_4\text{S}_3^{\bullet-}$, al ver que la absorción a 380 nm pierde la linealidad con el aumento de la concentración de sulfuro, cuando esta última es muy elevada.^{129,130}

La especie $\text{HSSH}^{\bullet-}$ se descompone al ser excitada irradiando con $\lambda = 347 \text{ nm}$ a $\text{pH}=7$: se observa un blanqueo (*bleaching*) de su banda de absorción a 380 nm.¹²⁹ La observación experimental sugiere la ruptura por excitación fotoquímica, y una evaluación teórica del primer estado excitado σ^* como disociativo avala la conclusión de los autores.^{129,133,134}

Ambos radicales pueden sufrir reacciones de recombinación. Han sido reportadas constantes cinéticas de recombinación de $\text{HS}^\bullet$, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y la recombinación cruzada, todas difusionales.¹²⁹



Además, tanto $\text{HS}^\bullet$ como $\text{HSSH}^{\bullet-}$ pueden reaccionar con el O_2 . El decaimiento del pico de absorción a 240 nm ($\text{HS}^\bullet$) se corresponde con el aumento de una señal en 255 nm, asignada a $\text{SO}_2^{\bullet-}$.¹³⁵ Luego, esta señal decae y aumenta la absorción en 225 nm, asignada a superóxido en su forma protonada, $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^\bullet$. Estas observaciones son consistentes también con experimentos de resonancia de espín (ESR, *electron spin resonance*).¹³⁵

El radical $\text{HS}^\bullet$ reacciona formando inicialmente un intermediario radicalario altamente reactivo, $\text{SOO}^{\bullet-}$, que luego se reorganizaría como $\text{OSO}^{\bullet-}$, conocido como radical sulfito (reacciones 1.34 y 1.35).¹³⁶



El radical sulfito reacciona rápidamente con más O_2 por transferencia electrónica, generando superóxido, $\text{HO}_2^\bullet$ (reacción 1.36). El dióxido de azufre, altamente soluble en agua, se solvata (reacción 1.37).



Por su parte, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ en presencia de O_2 decae rápidamente. Ha sido sugerido que la reacción con O_2 no forma productos de adición como en el caso de $\text{HS}^\bullet$. En cambio se produce una transferencia electrónica que da como producto superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$.¹²⁹ Este mecanismo simple es consistente con la observación de que la reacción es de primer orden respecto de $[\text{O}_2]$.



No han sido reportados detalles experimentales ni teóricos sobre el estado de transición.

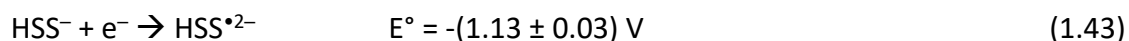
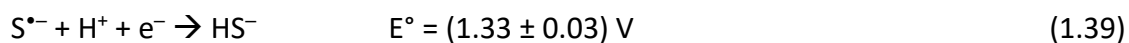
Las reacciones entre O_2 y las especies radicalarias pueden generar cadenas de propagación radicalarias, con formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y consecuentemente daño por estrés oxidativo en base a la formación de otros radicales.

Potenciales rédox de los radicales inorgánicos azufrados

Los potenciales rédox de estas especies radicalarias, así como otros parámetros termodinámicos, han sido objeto de estudio por diversos métodos debido a las complejas interacciones que hay entre ellas y con otras especies como el O_2 y otros aceptores de electrones. El uso de contraelectrodos para intentar estimar E° de las cuplas rédox que involucran $\text{HS}^\bullet$ y $\text{HSSH}^{\bullet-}$ presenta como desafío el corto tiempo de vida que tienen estas especies.^{48,129}

Los valores recomendados,⁴⁸ basados en estudios de radiólisis pulsada de sulfuro,^{50,129} y en valores reportados de $\Delta_f G^\circ$ para distintas RSS,⁹² ponen de manifiesto la alta reactividad de

estas especies (reacciones 1.39 a 1.43). Según los potenciales reportados, se requieren oxidantes fuertes para la formación de $\text{HS}^\bullet$ a partir de H_2S o HS^- . Una vez formado, este radical es muy oxidante, dando lugar a la posibilidad de cadenas de propagación en medio biológico, con la formación de distintas especies radicalarias.¹³²



Como se observa, los valores para distintos estados de protonación en el caso de la cupla sulfhidrilo/sulfuro (reacciones 1.39 a 1.42) varían +200 mV al desprotonar el radical, y -390 mV al desprotonar sulfuro. Como el estado de protonación de ambas especies tiene influencia en el potencial de la cupla, eso implica una regulación por parte del pH, pese a que en todos los casos resulta ser un radical muy reactivo.

1.1.4 Diagrama de Frost de RSS inorgánicas en anoxia

La reactividad cruzada entre RSS es una cuestión no menor para evaluar cinéticas que involucren la presencia de dos o más de ellas. En un estudio termodinámico en el cual se relevan datos experimentales de varios trabajos y se estiman algunas variables, se construyó un diagrama de Frost para especies inorgánicas y derivadas del glutatión.⁴⁷ En la figura 1.6 se muestra dicho diagrama sólo para las especies inorgánicas.

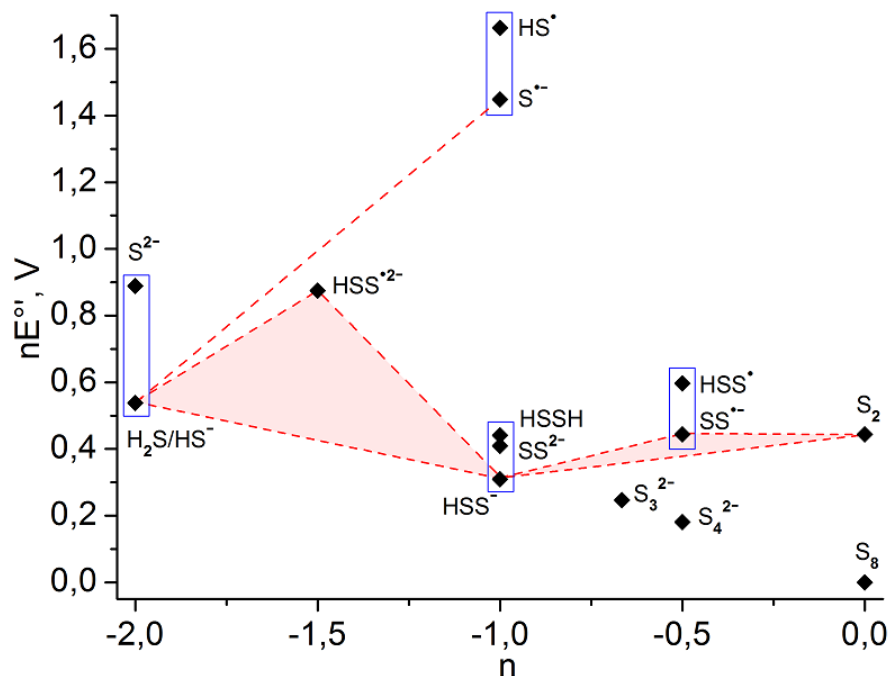


Figura 1.6. Diagrama de Frost de RSS inorgánicas. Las líneas rojas punteadas representan hemirreacciones cuyos potenciales han sido reportados. Adaptado de Koppenol y Bounds (2017).⁴⁷

El eje x representa los estados de oxidación n promedio de los átomos de azufre en las especies presentadas. El eje y es el producto de n y el potencial de electrodo E° a 25°C y pH=7, con lo cual es proporcional a ΔG° . En el diagrama se observan líneas marcadas por los autores que corresponden a hemirreacciones cuyos potenciales han sido reportados. La pendiente de las líneas son los potenciales de reducción de cada cupla conectada. Los triángulos con cúspide hacia arriba indican la posibilidad de una reacción de dismutación, por ejemplo, de la especie HSS^{*2-} y de la especie S_2^{*-} .⁴⁷ Del mismo modo, un triángulo con la cúspide hacia abajo podría implicar la posibilidad de comproporción entre dos especies, por ejemplo, S_2 y HS^- , que de hecho son los reactivos de partida para la síntesis de HSS^- .^{137,138} Según el diagrama, las especies S_2^{*-} y HSS^{*2-} podrían comproporcionar para dar HSS^- . Está reportado que la especie HSS^* decae más favorablemente por dimerización.

A partir de cálculos se observa además que S_2 posee mayor energía libre que el ciclo S_8 y que por lo tanto es proclive a la concatenación. No se mencionan, sin embargo, los pasos elementales que hipotéticamente podrían suceder en esa reacción química.

En el diagrama se observan especies que son parte de cuplas ácido-base. A pH = 7 se considera que prácticamente HS^- y H_2S están en igualdad de proporción y por ende comparten su posición en el diagrama. Las especies $\text{HS}^\bullet$, $\text{HSS}^\bullet$ y HSSH aparecen a mayores energías que sus bases conjugadas $\text{S}^{\bullet-}$, $\text{S}_2^{\bullet-}$ y HSS^- , lo cual sugiere que son más estables a pH neutro. Esto responde a que sus pK_a se estiman menores a 7. Hay discrepancias en la literatura respecto al valor de pK_a de $\text{HS}^\bullet$. Al momento, el valor recomendado por IUPAC para el pK_a de $\text{HS}^\bullet$ es de 3.4,⁴⁸ calculado en base a diferentes determinaciones y estimaciones. Los distintos valores reportados se presentan en la tabla 1.4.

Año	pK_a , cita	Metodología
1987	<7, ¹²⁹	Radiólisis pulsada de $\text{H}_2\text{S}(\text{aq})$ a distintos pH
1991	<<7, ¹³⁶	Cálculos de energía de Hartree-Fock y Espectroscopía ESR a distintos pH
1999	<3, ⁵⁰	Comparación directa de la cupla $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^\bullet$ con H_2O y $\text{HO}^\bullet$
2007	≈ 4 , ¹³⁹	Revisión: radiólisis pulsada de $\text{H}_2\text{S}(\text{aq})$ a distintos pH
2015	3.4. ⁴⁸	Cálculo a partir de constantes de equilibrio y estimaciones de constantes de Henry

Tabla 1.4. Valores de constante de acidez de literatura para $\text{HS}^\bullet$.

En el diagrama de Frost se observa que la especie dianiónica tetrasulfuro, S_4^{2-} , es particularmente estable. Más aún, la energía libre desciende cuando se considera la serie S_n^{2-} ($1 \leq n \leq 4$). Lo mismo ocurre con las especies $\text{S}^{\bullet-}$ y $\text{S}_2^{\bullet-}$. El diagrama ofrece, entonces, una herramienta dinámica que permite comprender la estabilidad relativa de las especies, la relación con el pH, y por ende qué especies químicas se esperan como destinos más probables de la interconversión entre RSS. La posición relativa de los pares conjugados ácido-base es crucial para entender la reactividad en función del pH, debido a la diferencia de reactividad entre las especies implicadas, como ha sido mencionado para el caso de $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$.⁴⁶

1.2 Fuentes y métodos de detección de RSS inorgánicas

1.2.1 Fuentes de sulfuro y disulfano para el trabajo en el laboratorio

El H₂S puede obtenerse de múltiples maneras. Un método clásico de obtención involucra la reacción de pirita con ácido clorhídrico concentrado (reacción 1.44).



Un procedimiento similar, pero más suave, consiste en la disolución de sales sódicas de sulfuro (Na₂S) en anaerobiosis, y el agregado de ácido fosfórico (H₃PO₄),¹⁴⁰ reacción 1.45.



Otra forma de utilizar sulfuro, que está ampliamente extendida en la literatura, es en forma de sales sódicas, disueltas de forma directa en agua o en el buffer de interés.^{141–143} Uno de los más utilizados es el sulfuro ácido hidratado NaHS.9H₂O debido a su menor costo con respecto al sulfuro de sodio anhidro Na₂S (normalizando el precio por mol de reactivo, el hidratado tiene un costo aproximadamente 40% menor). Sin embargo, está reportado que las fuentes comerciales de NaHS.9H₂O contienen trazas de especies oxidadas, polisulfuros, y que se han visto resultados no reproducibles en experimentos debido a la presencia de estos.¹⁴⁴ Por lo tanto, se recomienda el uso de Na₂S anhidro y su conservación en atmósfera inerte y seca (O₂ < 1 ppm ; H₂O < 1 ppm), a temperatura ambiente, porque esto asegura una pureza mejor respecto de otras fuentes comerciales.²²

Por su parte, el disulfuro disódico, Na₂S₂, puede obtenerse por reacción de S₈ con Na₂S (reacción 1.46). Nótese que la obtención de polisulfuros superiores también es posible, con lo cual la estequiometría es crítica.



Por otro lado, también existen sales comerciales de Na₂S₂, Na₂S₃ y Na₂S₄. Dada su mayor reactividad frente a oxidantes, el disulfuro es más sensible que el sulfuro frente a las concentraciones de O₂ remanente en el solvente que se utilice para preparar soluciones.

1.2.2 Detección espectroscópica de sulfuro y disulfuro por espectroscopía UV-Visible

Una técnica sencilla para la determinación en soluciones relativamente puras de sulfuro es la medición directa de la absorción UV-Visible. Soluciones básicas de sulfuro se pueden determinar por medio de la absorción en el UV a 230 nm de HS^- ($\epsilon_{230} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁴⁵. El pH de las soluciones madre de Na_2S empleadas en este trabajo de Tesis fue aproximadamente 12.

Los polisulfuros, que son productos de oxidación, poseen absorción intensa en la misma zona del espectro UV-Visible que el sulfuro, además de las bandas de absorción a longitudes de onda mayores.³⁵

Los espectros de distintos polisulfuros S_n^{2-} ($2 \leq n \leq 5$) han sido estudiados estimando las posiciones y absorptividades molares de las bandas de absorción observadas.³⁵ Los valores de longitud de onda y absorptividad molar reportados se resumen en la tabla 1.5.

	λ / nm	$\epsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
S_2^{2-}	358	850
S_3^{2-}	303	2280
	417	190
S_4^{2-}	303	3420
	368	960
S_5^{2-}	299	8000
	375	2560

Tabla 1.5. Valores máximos de absorción de polisulfuros aniónicos. Datos de Gigganbach et al. (1972).³⁵

1.2.3 Métodos analíticos para la cuantificación de RSS inorgánicas

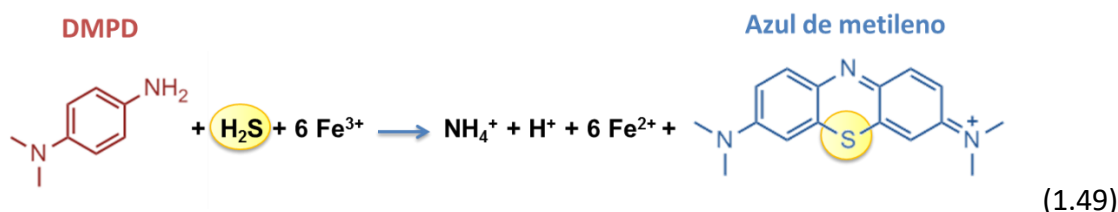
En la presente Tesis han sido utilizados distintos métodos para hacer las determinaciones de las concentraciones de RSS inorgánicas, además de la medición directa por UV-Vis.

En primer lugar, la iodometría es una técnica de titulación redox por diferencia, basada en la reacción entre un exceso de I_2 y un reductor, en este caso H_2S (reacción 1.47), para luego valorar el remanente de I_2 con tiosulfato (reacción 1.48).



La adición de almidón, que forma un complejo de color azul intenso, facilita la observación del punto final. Esta técnica tiene la desventaja de que cualquier especie redox sensible a I_2 es detectable, es decir que es poco específica.

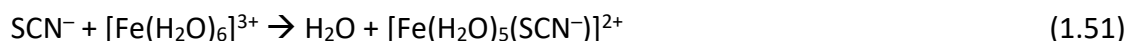
Otra técnica colorimétrica empleada consiste en la síntesis de azul de metileno (MB^+ , *methylene blue*) a partir de sulfuro y un precursor orgánico llamado N,N-dimetil-para-fenilendiamina (DMPD), en medio ácido y en presencia de iones Fe^{3+} como oxidante (reacción 1.49).¹⁴⁶



Este método puede ser usado para titular concentraciones de sulfuro en mezclas complejas haciendo los blancos y controles adecuados, incluso con proteínas que tengan absorción en el visible como las hemoproteínas. La concentración obtenida de azul de metileno se considera cuantitativa en términos de irreversibilidad de la reacción 1.49 y puede ser cuantificada por espectrofotometría UV-Visible ($\epsilon_{668} = 34000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹⁴⁷ El rango lineal es acotado, y la sensibilidad es relativamente baja, del orden de concentraciones μM . Esta técnica también detecta la presencia de HSS^- , aunque con menor sensibilidad.

Un potencial problema con esta técnica es la posibilidad de que el azul de metileno reaccione con más sulfuro.¹⁴⁸ Más aún, en presencia de O_2 se conoce un sistema de reacciones oscilante.¹⁴⁸ Esta complejidad adicional requiere atención para el uso de la técnica cuantitativa.

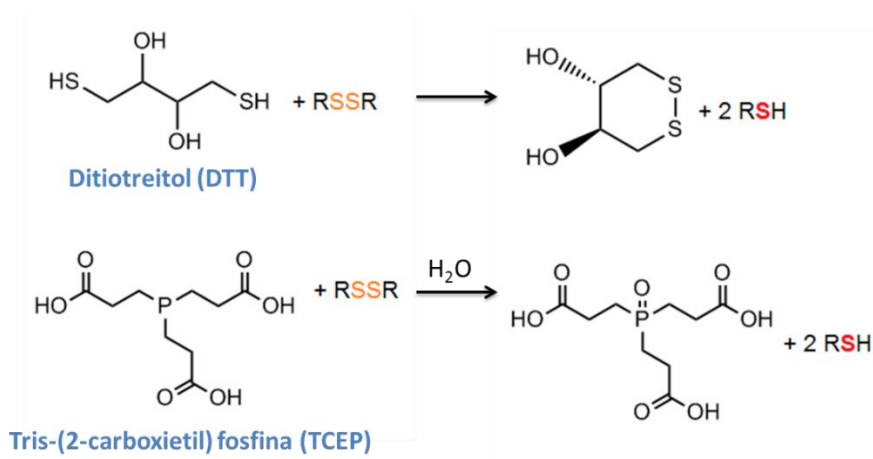
La cianólisis es una técnica colorimétrica utilizada para la detección y cuantificación de especies de azufre sulfano. La definición de azufre sulfano ha sido variable en la literatura.^{149–151} Entendemos sulfano como aquel azufre unido únicamente con otros átomos de azufre y/o protones ionizables. La primera publicación de la técnica consistía en la detección de $S_2O_3^{2-}$ por medio de la reacción con cianuro en presencia de iones Cu^{2+} , denominada método de Sörbo.¹⁵² Años más tarde fue modificada en función de los artefactos o limitaciones halladas.¹⁴⁹ El método consiste en la reactividad que tiene el cianuro (CN^-), que ataca nucleofílicamente S en una cadena generando como producto el anión tiocianato (SCN^-). Luego, el tiocianato es cuantificable por reacción con Fe^{3+} , formando el complejo rojizo $[Fe(H_2O)_5(SCN^-)]^{2+}$ de alta absortividad molar a 460 nm, que se cuantifica por espectroscopía UV-Visible (reacciones 1.50 y 1.51). El rango lineal de esta técnica colorimétrica respecto de la concentración de SCN^- formado es de 10 a 1000 μM .



Según las especies de azufre sulfano que se desean cuantificar, la cianólisis puede realizarse en frío o en caliente. La cianólisis en caliente permite cuantificar algunas especies que no se detectan por la técnica en frío, ya que son menos reactivas, como tiosulfonatos, tiosulfato y tritionatos.¹⁴⁹ El tiosulfato podría ser cuantificado por cianólisis fría en presencia de Cu^{2+} ya que este opera como catalizador.¹⁴⁹ En la presente Tesis sólo hemos utilizado la cianólisis en frío.

Es un método útil para proteínas purificadas o muestras relativamente simples. No obstante, la selectividad y especificidad de la técnica es baja. Son numerosas las interferencias que podrían llevar a sobreestimaciones de las concentraciones de S sulfano. Por ejemplo, la técnica no distingue persulfuros (RSS^-), polisulfuros orgánicos (RSS_n^-) ni sus análogos inorgánicos.¹⁵³ Se ha establecido una escala de reactividad en la que los persulfuros son las especies más reactivas y en último lugar se ubica el azufre elemental. Los polisulfuros inorgánicos no están reportados en dicha escala de reactividad.¹⁴⁹

Además de la cianólisis, existen métodos indirectos para cuantificar RSS oxidadas. El disulfano y sus bases conjugadas y otros polisulfuros pueden ser reducidos por acción de agentes reductores como el ditiotreitól (DTT) o la fosfina reductora tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, *Tris(2-carboxyethyl)phosphine*),^{154,155} esquema 1.3. De esta manera, se reduce todo el azufre a estado de oxidación -2 y puede ser detectado por las técnicas colorimétricas para H₂S.



Esquema 1.3. Estructura y reacciones de reducción de especies de azufre oxidado por DTT (arriba) y TCEP (abajo). *R* puede ser H, R'S_n o un radical alquílico.

La reducción con estos agentes no distingue especies oxidadas orgánicas de inorgánicas, y por lo tanto es sensible a la presencia de persulfuros o polisulfuros orgánicos. En muestras que contengan H₂S y H₂S_n en simultáneo, se pueden realizar métodos de cuantificación con y sin tratamiento reductor, titulando el azufre oxidado por diferencia.

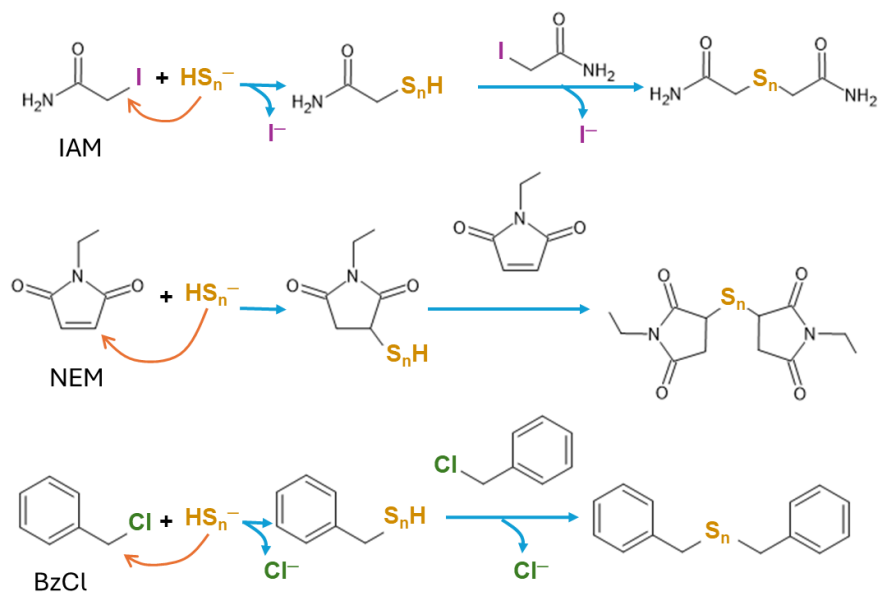
En la presente Tesis hemos utilizado TCEP. Su uso tiene diversas ventajas frente a DTT: el rango de pH en que puede ser utilizado es mayor, dado que el DTT está limitado a pH > 7 en su forma tiolato con pK_as 9.2 y 10.1 mientras que TCEP no tiene protones ácidos que afecten su reactividad; TCEP es más estable para su manipulación y el sólido de partida no se oxida al aire; su potencial de reducción es un poco más bajo que el de DTT (-0.31 V vs. -0.29 V) y además la cinética de reducción de enlaces S-S por TCEP es más rápida.¹⁵⁶ Una desventaja del uso de TCEP es que este puede reaccionar con alquilantes como los que se presentan en la siguiente sección.

1.2.4 Derivatización con alquilantes y análisis de los derivados

Como especies nucleofílicas, los polisulfuros son capaces de atacar moléculas orgánicas que contengan posiciones electrófilas. En el caso de sulfuro y disulfuro, se generan derivados doblemente alquilados RS_nR (esquema 1.4).

El cloruro de bencilo (BzCl), o el bromuro de bencilo (BzBr) son ejemplos de alquilantes. El carbono bencílico de estas especies es electrofílico y se genera el derivado dibencílico correspondiente (esquema 1.4). Este derivado, soluble en medio orgánico, puede ser analizado por 1H y ^{13}C RMN, ya que las señales para polisulfuros de hasta 4 átomos de azufre han sido reportadas.^{95,157}

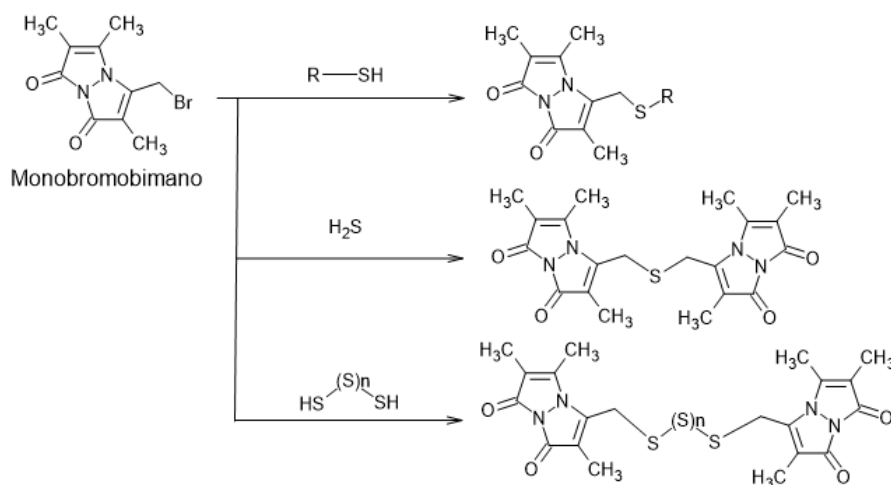
También podrían ser empleados como alquilantes la iodoacetamida (IAM) y la N-etil-maleimida (NEM), dos alquilantes posibles para la detección y cuantificación. El derivado obtenido puede ser analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que puede acoplarse a espectrometría de masa (MS). En la presente Tesis no hemos utilizado estos dos reactivos.



Esquema 1.4. Reacciones de adición electrofílica de NEM, y sustitución electrofílica de IAM o BzCl sobre HS_n^- , $n \geq 1$.

Para el caso de la IAM y especialmente NEM, los productos formados son proclives a la ruptura de los enlaces S-S intermedios por más reacciones de sustitución, perdiendo información acerca de la composición relativa de la muestra. En base al efecto protector que ejercen la tirosina sobre los polisulfuros de biotioles frente a la hidrólisis,¹⁵⁸ han sido diseñados y reportados análogos más eficientes de IAM, ya que poseen un efecto protector sobre los polisulfuros.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Otro alquilante de utilidad para el análisis de RSS es el monobromobimano (mBB), pese a que no fue utilizado en esta Tesis por cuestiones de disponibilidad. Es un reactivo que forma compuestos de sustitución con sulfuro,^{162,163} tioles,¹⁴ y polisulfuros.^{14,164} La estabilidad de los últimos, sin embargo, está puesta en duda por la reactividad de los enlaces S-S intermedios. En el caso del H_2S y H_2S_n , al tener dos H terminales se producen aductos dibimanados (esquema 1.5). Los derivados dibimanados se analizan por HPLC con detección fluorescente (excitación a 370 nm, emisión a 485 nm). La técnica requiere el uso de patrones para identificar los picos. Tentativamente se podría acoplar HPLC a MS mediante ionización por electrospray (ESI) para identificación. La sensibilidad de esta técnica se encuentra en el rango nM.



Esquema 1.5. Derivatización con monobromobimano (mBB) de un tiol (arriba), sulfuro de hidrógeno (centro) y un polisulfano (abajo).

No obstante, los métodos de alquilación tienen limitaciones. En condiciones biorrelevantes, el tiempo característico de la reacción de desproporción de polisulfuros es breve. La

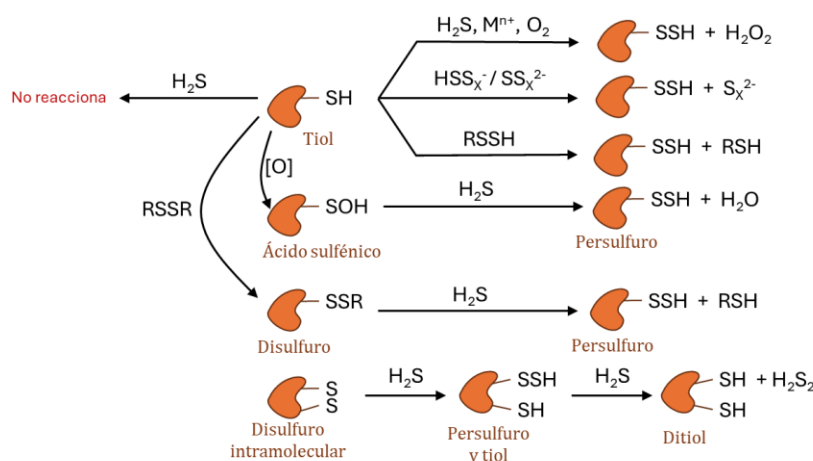
constante de velocidad es $k \approx 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $\text{pH} = 8.0$.¹⁶⁵ Los equilibrios de especiación dependientes de la temperatura que han sido estudiados son más rápidos que las reacciones de alquilación con los agentes aquí presentados.^{95,166}

1.3 Destinos bioquímicos de las especies H_2S_n

Sus destinos bioquímicos son objeto de creciente investigación.^{7,8,11,12,84} En particular para sulfuro y eventualmente disulfuro y trisulfuro, se podrían distinguir familias de destinos bioquímicos, dada la similitud de su reactividad, o su interrelación: 1) Tioles de proteínas y biotioles; 2) Otros gasotransmisores (CO y NO); 3) Metaloproteínas, siendo de particular interés en esta Tesis las hemoproteínas.

1.3.1 Tioles de proteínas y biotioles

Todos los tioles orgánicos (RSH/RS^-) así como las especies derivadas de ellos son capaces de reaccionar con polisulfuros. Los disulfuros (RSSR'), los ácidos sulfénicos (RSOH) y los tioles en presencia de oxidantes (metales, O_2), son dianas de H_2S para la formación de persulfuros.¹⁰⁸ Las reacciones de persulfidación son versátiles en cuanto a las especies reactivas que pueden provocarlas, y por lo tanto también son varios los posibles productos secundarios (esquema 1.6).



Esquema 1.6. Reactividad de tioles y sus derivados frente a distintas RSS. Adaptado de Filipovic (2015).¹⁶⁷

Uno de los destinos más documentados de H₂S es la SQOR (con un trisulfuro o disulfuro orgánico) como hemos mencionado en la sección 1.1.1. Otro destino interesante de este grupo son los puentes disulfuro de otras proteínas, que son productos de oxidación de tioles,¹⁴² que tienen influencia en mayor o menor medida sobre la estructura terciaria de proteínas. Los puentes disulfuro sufren una reacción llamada sulfhidración, dando como resultado la apertura del puente (reacción 1.52).



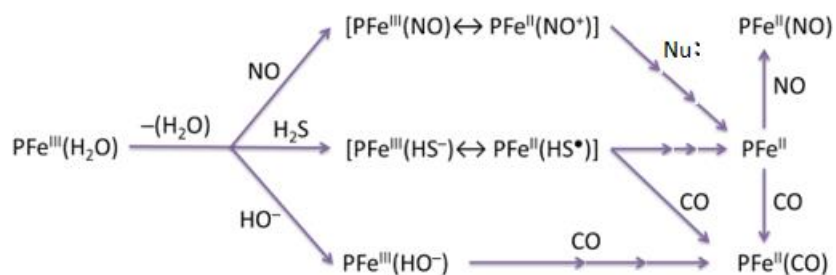
1.3.2 CO y NO, diálogo químico

Como mencionamos en la sección 1.1.1, el H₂S, el CO y el NO comparten destinos bioquímicos y participan de diálogo químico ya sea entre sí o con especies relacionadas.^{60,168}

Entre los destinos bioquímicos compartidos por NO, CO y H₂S se destacan por un lado los tioles y sus productos de oxidación, sobre todo en el caso de H₂S y NO, con la formación de especies reactivas de nitrógeno y azufre, como los nitrosotioles (RSNO), los nitrosopersulfuros (RSSNO), y sus análogos inorgánicos ácido tionitroso (HSNO) y pertionitrito (SSNO⁻). La formación de estas especies mixtas es de interés por su participación en mecanismos de regulación de NO por reacción con persulfuros,¹⁶⁹ centros metálicos,⁶⁵ o liberación de HNO por reacción con tioles o con el sistema tiorredoxina.⁶⁵

Por otro lado, y de interés en la presente Tesis, NO, CO y H₂S comparten como destino bioquímico el centro metálico de metaloproteínas, en particular las hemoproteínas. Su coordinación a hierro está sujeta a selectividad. Mientras que H₂S se coordina a especies férricas principalmente, y que CO se coordina sólo a especies ferrosas, NO puede coordinarse tanto a especies ferrosas como férricas.

Además de coordinarse, NO, CO y H₂S pueden producir la reducción del hierro férrico por distintos mecanismos que han sido estudiados bajo los nombres de nitrosilación reductiva,¹⁷⁰⁻¹⁷² carbonilación reductiva,¹⁷³ y sulfhidración reductiva¹⁷⁴ respectivamente (esquema 1.7). El detalle mecanístico está más documentado para el caso del NO,¹⁷⁰ mientras que para H₂S y CO quedan vacancias por explorar,⁸ que han sido abordadas con distinto alcance en el presente trabajo de Tesis (Capítulos 2 y 4).



Esquema 1.7. Esquema simplificado de reacciones de reducción de porfirinatos férricos por NO (arriba), H_2S (centro) y CO (abajo).

En los casos de la interacción entre Fe^{III} y NO o H_2S , ha sido propuesto que los complejos de coordinación férricos poseen una deslocalización parcial de carga, que los autores describen como formas resonantes entre Fe^{III} y Fe^{II} .^{170,175,176} Esta deslocalización de carga afecta al centro metálico, y facilita su reducción mediada por el propio ligando. En el caso de la reducción asistida por CO, se han observado procesos de carbonilación reductiva en la escala de días, muy posiblemente debido a la pobre química rédox del CO.¹⁷³ Una interacción interesante entre gasotransmisores se da entre HS^- y CO, puesto que la presencia del segundo acelera la reducción del complejo tipo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.^{174,176}

1.3.3 La mioglobina como globina modelo

La mioglobina (Mb) es una hemoproteína (HP) monomérica de la subfamilia de las globinas, que incluye además a la hemoglobina, la citoglobina, la neuroglobina y la globina X. Presentan una estructura terciaria altamente conservada. Si se comparan las secuencias de aminoácidos de las mioglobinas de humano, de corazón equino y de cachalote, se observa una homología mayor al 80% entre ellas.

La Mb, que en general se aproxima a los 150 residuos de longitud, se caracteriza por un grupo hemo rodeado por 8 α -hélices. Estas hélices son designadas de la A a la H desde el extremo N-terminal N al C-terminal (figura 1.7, panel A). Las hélices A, B, C y E conforman la cavidad distal del hemo y las hélices F, G y H se ubican en el lado proximal (figura 1.7, panel B).¹⁷⁷

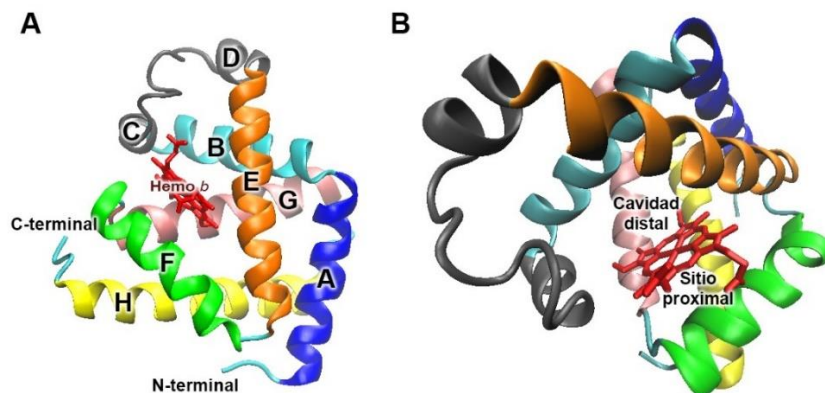


Figura 1.7. Estructura terciaria representativa de las globinas. A) componentes de la estructura terciaria, α -hélices y grupo prostético, hemo b; B) Sitio proximal y cavidad distal.

Como grupo prostético, las Mbs tienen bases conjugadas de porfirinas, que actúan como ligandos polidentados planos frente a Fe^{II} o Fe^{III} . En particular, en las Mbs hay un hemo de tipo b (figura 1.8). Pueden incorporar dos ligandos más, dándole al Fe central una geometría de coordinación octaédrica. Comúnmente, se nombra Mb a la especie reducida MbFe^{II} , mientras que la especie oxidada recibe el nombre de metmioglobina, MbFe^{III} .

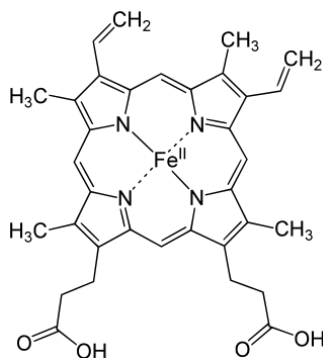


Figura 1.8. Hemo tipo b

En las Mbs uno de los ligandos del hierro es el grupo imidazol de una histidina, y se lo llama *ligando proximal* porque está directamente coordinado al hierro hémico. La interacción del hidrógeno del grupo imidazol unido a nitrógeno con otros aminoácidos del entorno proximal es clave en la modulación de la reactividad centrada en el metal. Del lado opuesto del grupo hemo, se define una *cavidad distal*, en la que los restos aminoacídicos circundantes participan del control de acceso de ligandos (o sustratos) al sitio activo y de la

estabilización de la interacción de estos con el hierro hémico (figura 1.9). El acceso a la cavidad distal requiere la migración a través de un canal, que limita la entrada de ligandos. Asimismo, la mioglobina contiene un residuo histidina distal que dependiendo de su estado de protonación y conformación, actúa como una puerta de entrada que permite o dificulta el acceso (*histidine gate*).¹⁷⁸

Algunas hemoglobinas pueden presentarse pentacoordinadas, es decir que en la cavidad distal no poseen un sexto ligando, por ejemplo, la MbFe^{II}. Otras hemoproteínas pueden tener una molécula de H₂O como sexto ligando en su forma de reposo, tal es el caso de la MbFe^{III} y de las subunidades de la methemoglobina. En otros casos, la sexta posición de coordinación puede estar ocupada por un residuo aminoacídico de la cadena proteica, por ejemplo, en la neuroglobina.

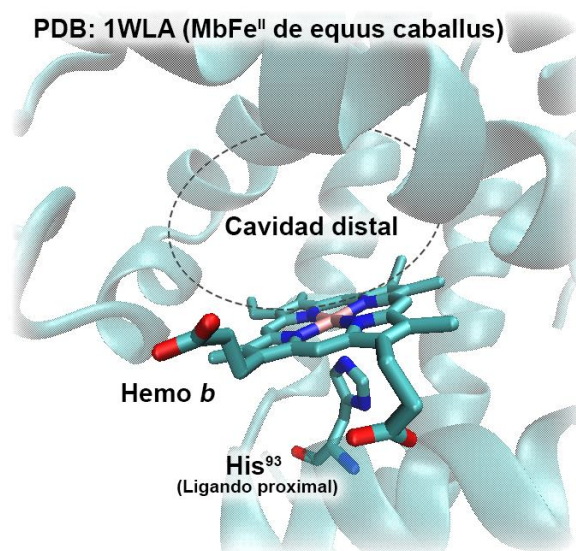


Figura 1.9. Sitio activo de la mioglobina de corazón equino. Estructura de Protein Data Bank (PDB), código 1WLA, correspondiente a MbFe^{II}. El residuo His⁹³ se coordina al hierro hémico como ligando proximal. MbFe^{II} no posee ligando en la cavidad distal, es una especie pentacoordinada.

El imidazol de la histidina que se une como ligando proximal, se suma a la interacción de los grupos propionato propios del hemo tipo b y otorga mayor estabilidad a la unión del grupo prostético a la apoproteína. Además, puede desplazar al hierro levemente respecto del plano del anillo porfirínico. Estas interacciones son lábiles en medio ácido. Esto puede ser

explotado para la remoción del grupo hemo y la ubicación de grupos hemo modificados como grupos prostéticos no nativos.¹⁷⁹

El estado rédox del hierro condiciona la afinidad de ligandos en la sexta posición. A su vez, el estado electrónico del hierro es afectado por la naturaleza del ligando. Una característica que da cuenta de esto es el estado de espín del hierro, que para complejos férricos puede ser 1/2 (LS, *low spin*), 3/2 o 5/2 (HS, *high spin*). Ejemplos de esta dependencia son los complejos de HO⁻, HS⁻ y CN⁻ que son de bajo espín, mientras que el complejo férrico de H₂O es de alto espín. Esto significa que algunos intercambios de ligando conllevan un cambio en el estado de espín del sistema.

Proteína	Especie	Accesibilidad /Å ²	%
Hemo b libre	-	829	100
Neuroglobina	Homo sapiens	90	10.8
Neuroglobina	Mus musculus	132	15.9
Hemoglobina	Homo sapiens	134	16.1
Hemoglobina	Vitreoscilla stecoraria	169	20.4
Neuroglobina	Homo sapiens	90	10.8
Citoglobina	Homo sapiens	135	16.3
Mioglobina	Physeter Catodon	147	17.7
Mioglobina	Thunnus albacares	143	17.2
Catalasa	Homo sapiens	2	0.2
IDO1	Homo sapiens	92	11.1
Hemoxigenasa	Homo sapiens	247	29.8
NO sintasa	Homo sapiens	122	14.7
Albúmina	Homo sapiens	66	7.9
CBS	Homo sapiens	148	17.8
Nitroforina	Rhodnius prolixus	130	15.7

Tabla 1.6. Accesibilidad de solvente de hemoproteínas seleccionadas. Adaptado de Schneider et al. (2007, material suplementario).¹⁸⁰

La mioglobina de corazón equino constituye un modelo minimalista de hemoglobina, que resulta particularmente útil para minimizar variables y hacer estudios mecanísticos, en nuestro caso particular, empleando RSS. En primer lugar, la mioglobina equina no posee cisteínas en su secuencia. Dado que los tioles de proteínas son capaces de reaccionar con RSS inorgánicas de azufre, la ausencia de estos en la secuencia evita reacciones paralelas, como las persulfidaciones, la formación o ruptura de puentes disulfuro. En segundo lugar, es una proteína monomérica, eliminando la posibilidad de efectos alostéricos, que agregan complejidad al análisis primario de la interacción con ligandos.¹⁷⁴ Por último, es importante mencionar que el grupo hemo de la MbFe^{III} tiene una accesibilidad del solvente de 142-147 Å², que representa un 17-18% comparado con la accesibilidad del hemo libre, de 829 Å².¹⁸⁰ Eso quiere decir que su grupo hemo está significativamente cubierto con un acceso limitado del solvente. Se presenta la accesibilidad de solvente de algunas hemoproteínas seleccionadas en la tabla 1.6.

Se puede observar que en líneas generales las hemoproteínas tienen un grado de exposición del grupo hemo al solvente bajo, de entre un 10 y 20%. La mioglobina, que se ubica próxima a un valor medio en este aspecto, puede ser considerada representativa en relación con la presencia de moléculas de agua en la cavidad distal.

1.4 Antecedentes de interacción entre hemoproteínas y H₂S

1.4.1 Formación y estabilidad de complejos con H₂S

El hallazgo pionero de reactividad de hemoproteínas (HPs) con H₂S es el caso de la hemoglobina I de *Lucina pectinata* (Lp-HbI), un molusco que habita en barros con alto contenido de sulfuro. La Lp-HbI en su forma férrica muestra una elevada afinidad por el sulfuro ($K_{\text{afinidad}} = K_{\text{aff}} = 10^9 \text{ M}^{-1}$, pH=5.5, T=20°C).¹⁸¹ Junto a la hemoglobina de *Vitreoscilla*, son las proteínas que a la fecha presentan las constantes de afinidad por sulfuro más elevadas.^{168,182}

Al presente, han sido reportados más de 40 ejemplos que incluyen hemoproteínas nativas, mutantes y también compuestos modelo. En estos estudios se han hecho determinaciones cinéticas de constantes de unión en soluciones acuosas de pH regulado.⁹ Los valores

reportados para la unión (k_{on}) son en su mayoría del orden de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ con algunas excepciones. Este valor predominante para k_{on} sugiere un mecanismo común, de tipo disociativo, que involucra la salida de la molécula de agua de la posición distal, previo a la coordinación del sulfuro. Las excepciones mencionadas refieren a valores algo alejados de $k_{on}=10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y se explicarían por cierta componente asociativa en el mecanismo de formación del complejo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.

En contraste, los valores de la constante de disociación del complejo (k_{off}) presentan valores más dispersos. Como la constante de afinidad de estos complejos se calcula mediante el cociente de estas dos magnitudes ($K_{aff}=k_{on}/k_{off}$), las constantes de afinidad cinéticas varían en el intervalo entre 10^3 y 10^9 M^{-1} .⁹

Está aceptado en la literatura que la especie coordinada es el anión HS^- , teniendo en cuenta el pK_{a1} de H_2S cercano a 7, y que al coordinarse este puede volverse más ácido.

La formación del enlace de coordinación Fe-S ha sido puesta en evidencia tanto en la espectroscopía UV-Vis, como por Raman resonante,^{140,183} y por EPR.^{141,176,184,185} Los complejos $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ obtenidos para distintos sistemas han sido descritos como complejos hexacoordinados de bajo espín (6cLS).¹⁸⁶

La coordinación de H_2S al hierro hémico ha sido descrita como punto de partida de procesos potencialmente funcionales. Tales son los casos de la metemoglobina (HbFe^{III}) porcina,¹⁸² bovina,¹⁸⁷ y humana,¹⁸⁴ MbFe^{III} equina de corazón¹⁸⁷ y de músculo esquelético,¹⁴³ $\text{NgbFe}^{\text{III}}$,¹⁸⁸ mieloperoxidasa,¹⁸⁵ lactoperoxidasa,¹⁸⁹ peroxidasa tiroidea,¹⁹⁰ superóxido dismutasa,¹⁹¹ catalasa,¹⁹² citocromo c,¹⁹³ y citocromo c oxidasa.⁵³

Los estudios cinéticos de la unión de H_2S a HbFe^{III} y al caso que nos convoca, MbFe^{III} sugieren la coordinación en un paso, con trazas cinéticas monoexponenciales obtenidas por técnicas de flujo detenido (figura 1.10),^{143,174,184} (reacciones 1.53/1.54).



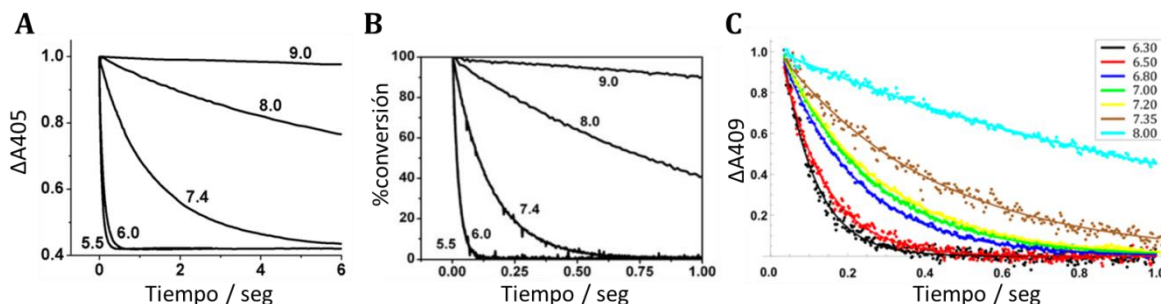
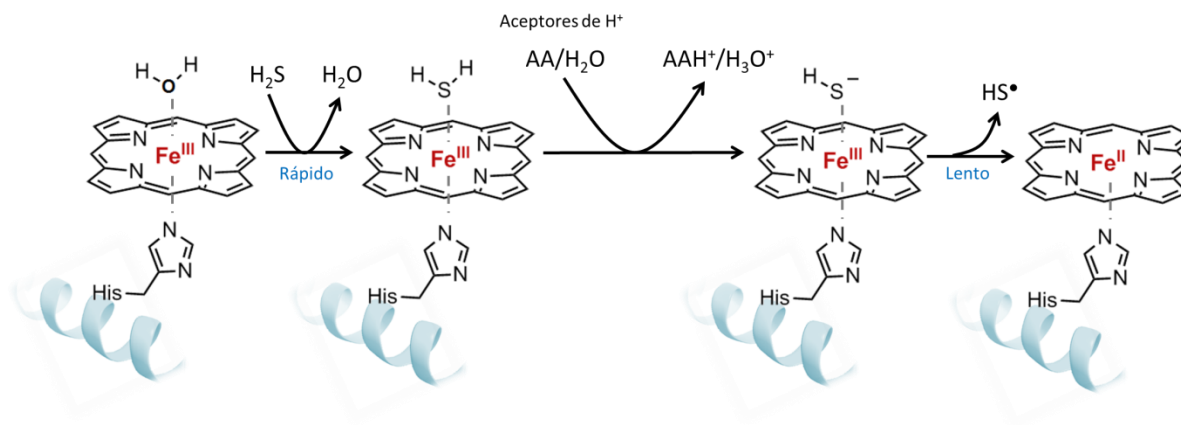


Figura 1.10. Medidas de flujo detenido del decaimiento de A) HbFe^{III} 2.5 μM en buffer HEPES por agregado de Na_2S 2 mM en condiciones aeróbicas, extraído de Vitvitsky et al (2015)¹⁸⁴; B) MbFe^{III} 5 μM en buffer HEPES por agregado de Na_2S 2 mM en condiciones anóxicas, extraído de Bostelaar et al (2016)¹⁴¹; C) MbFe^{III} 10 μM en buffer fosfato por agregado de Na_2S 1 mM en condiciones anóxicas, extraído de Boubeta et al. (2018).¹⁴³

En contraste, la neuroglobina, Ngb, que es hexacoordinada, muestra un comportamiento bifásico en función del tiempo para la unión de H_2S ,¹⁸⁸ explicado en términos de dos pasos de reacción: un primer paso de coordinación rápida, dependiente de $[\text{H}_2\text{S}]$ y un segundo paso, más lento ($k = 5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), independiente de $[\text{H}_2\text{S}]$ y del pH, atribuido a cambios estructurales. Una hipótesis plausible es la participación del puente disulfuro, que los autores reportan que es difícil de mantener en su estado oxidado en condiciones *in vitro*.¹⁸⁸

Efectos distales

Ha sido propuesto que los aminoácidos distales aceptores de protones controlan la tasa de reducción de la Lp-HbI férrica y de mutantes seleccionadas.⁵⁵ El estudio sugiere que la presencia de aminoácidos distales de baja polaridad forma complejos hemo férricos- SH_2 estables e impide la reducción centrada en el metal; por el contrario, la presencia de aminoácidos aceptores de protones puede promover la desprotonación del sulfuro coordinado formando $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ (esquema 1.8). Se ha propuesto que posteriormente reacciona con un segundo H_2S en Lp-HbI,¹⁹⁴ y en hemoglobina humana.^{195,196} Las evidencias experimentales de velocidad de la subsiguiente reducción de hemoglobina, que es más lenta a mayores concentraciones de sulfuro,¹⁷⁴ sugieren que no actúa un segundo equivalente de este, sino que la reducción sería más probable por una ruptura homolítica del complejo (esquema 1.8).



Esquema 1.8. Coordinación de H_2S sobre complejo férrico acuo de una hemoproteína y desprotonación del sulfuro una vez coordinado por medio de aminoácidos de la cavidad distal (AA) o moléculas de agua del medio; posterior paso de reducción lenta del centro metálico.

Un análisis teórico por medio de cálculos QM-MM en la Lp-HbI, sugiere que la primera desprotonación del H_2S coordinado no tiene barrera energética.¹⁹⁷

Los compuestos modelo férricos, desprovistos de cavidad distal, pero rodeados de moléculas de agua como potenciales aceptores de protones por el H_2S muestran una velocidad de reducción del centro metálico relativamente baja.^{140,198} De hecho, los complejos tienen un tiempo de vida de minutos a horas, independientemente del papel potencial de las moléculas de agua circundantes que actúan como aceptores de protones, y estabilizados por un residuo proximal de histidina.

Una evaluación teórica muy reciente de los enlaces S-H del sulfuro coordinado al hierro hémico de Lp-HbI que compara a la forma nativa con mutantes de la Gln distal y de los residuos hidrofóbicos de la cavidad, sugiere que hay una retroalimentación mutua entre la fuerza de la unión Fe-S y la facilidad de la desprotonación del H_2S una vez coordinado, y que a su vez este enlace Fe-S depende del campo electrostático interno de la cavidad distal.¹⁹⁹ Esto nos permite concluir que la naturaleza de la cavidad distal modula la reactividad de las hemoproteínas frente a sulfuro.

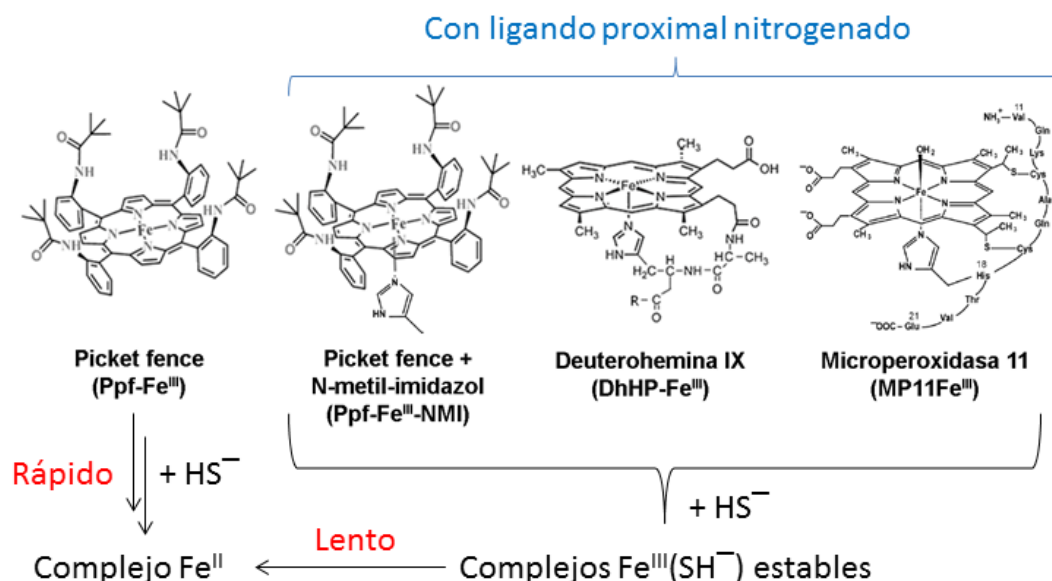
La mutación de la histidina distal de la NgbFe^{III} por alanina hace que su sexto ligando sea H_2O , y le confiere reactividad similar a HbFe^{III} y MbFe^{III}. Esta mutación equipara la K_{aff} de NgbFe^{III} por sulfuro, a las de HbFe^{III} y MbFe^{III}, que en la forma nativa es un orden menor. De

modo similar, la mutación de la glutamina distal de la Hbl de *L. pectinata* por una histidina, le provee reactividad similar a la de Hb humana.^{9,55,184,200} La presencia de efectos de control distal en la reactividad de globinas sugiere que el mecanismo de la reducción es de esfera interna, es decir, depende de la formación previa del complejo de coordinación y de su estabilidad.

Estabilización proximal

La ausencia de una especie nitrogenada como quinto ligando del grupo hemo permite que los complejos de sulfuro una vez formados produzcan rápidamente la reducción del metal central. Por el contrario, la presencia de dichos ligandos proximales permite la preparación de complejos de sulfuro de diversa estabilidad. Esto se evidencia en un amplio intervalo de valores de constantes de disociación, que van desde 10^{-5} hasta 10 s^{-1} y, consecuentemente, en un intervalo igualmente amplio de constantes de equilibrio K_{aff} . En particular, el caso de un hemopéptido modelo sin cavidad distal, la N-acetil-microperoxidasa 11, $\text{NAcMP11Fe}^{\text{III}}$, es representativo, porque al no tener aminoácidos distales, el control de la interacción el sulfuro con el hierro hémico está a cargo de la histidina proximal.

Existen estudios realizados en modelos llamados *picket-fence*, en alusión a la presencia de una especie de vallado distal, formado por sustituyentes con grupos aceptores de puentes de hidrógeno (esquema 1.9). Estos estudios han sido realizados en medio orgánico.^{175,201} Ha sido observado que estos modelos desprovistos de un ligando proximal nitrogenado en presencia de HS^- sufren rápidamente la reducción del metal central a temperatura ambiente. No obstante, al realizar un experimento análogo de agregado de sulfuro en metanol a baja temperatura (-80°C) con otros grupos hemo sintéticos más simples, se observa la formación de un intermediario $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.¹⁷⁵ Los autores concluyeron que la formación del complejo intermediario es un paso previo a la reducción del metal.

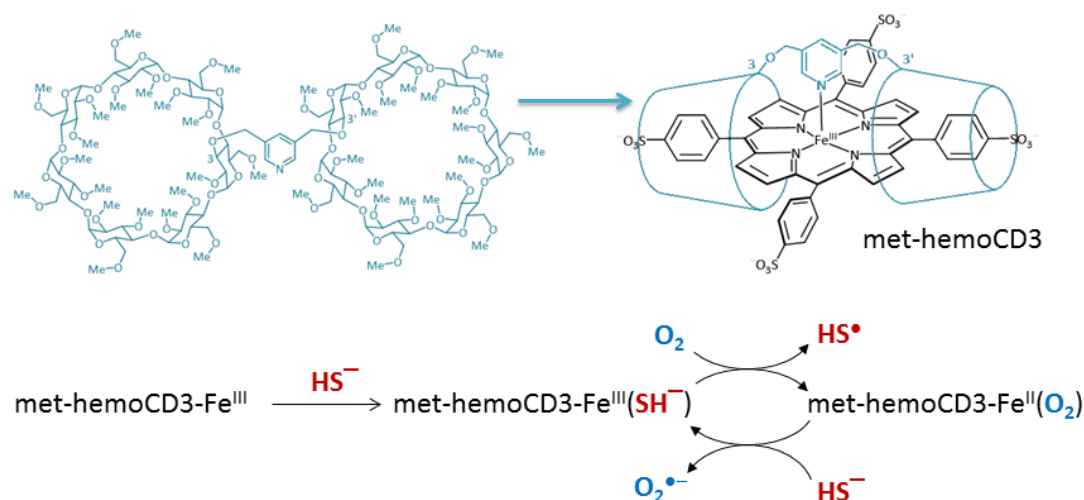


Esquema 1.9. Reactividad de modelos de Mb con hidrosulfuro, respecto de la presencia o ausencia de ligandos proximales nitrogenados (N-metil-imidazol e histidina).

Como se mencionó anteriormente, NAcMP11Fe^{III} constituye un modelo de hierro hémico sin interacciones distales, pero con un ligando proximal nitrogenado, el resto imidazol de una histidina. En presencia de exceso de sulfuro se observa la formación de un complejo relativamente estable, que fue caracterizado por espectroscopía UV-Visible y RR. La participación de interacciones proximales en la estabilización del complejo con sulfuro fue estudiada también computacionalmente en NAcMP11Fe^{III} y en una serie de compuestos modelo derivados de la deuterohemina conteniendo péptidos de distinto largo de cadena (esquema 1.9).¹⁹⁸

En NAcMP11Fe^{III} se observó que ninguno de los aminoácidos de la cadena polipeptídica interactúa con el ligando H₂S/HS⁻, quedando este totalmente expuesto al solvente. Más aún, en ambos sistemas (NAcMP11Fe^{III} y deuteroheminas) se observó que la formación de puentes de hidrógeno adicionales por parte de la histidina proximal con aminoácidos de la cadena peptídica, puede aumentar la estabilización del complejo Fe^{III}(SH⁻) correspondiente.¹⁴⁰ Estos resultados sugieren que existe un efecto de estabilización proximal, incluso en ausencia de interacciones distales.^{143,198}

El uso de un complejo de inclusión 1:1 de un porfirinato de hierro soluble en agua en un dímero de β -ciclodextrina (CD) metilada, proporcionó evidencias adicionales sobre el papel del ligando proximal.¹⁷⁶ Estos sistemas, denominados methemociclodextrinas o met-hemoCDs, han sido caracterizados y utilizados para imitar hemoproteínas en soluciones acuosas, con un entorno hidrofóbico en el sitio de unión.



Esquema 1.10. Estructura y reactividad del modelo met-hemoCD3. Arriba, estructura de ciclodextrinas y ensamble con el porfirinato de hierro. Abajo, coordinación de hidrosulfuro y ciclo de descomposición oxidativa mediada por este modelo de hemoproteínas.

La reactividad del complejo férrico con sulfuro de met-hemoCD fue evaluada frente a O₂ (esquema 1.10) obteniendo como producto la formación del correspondiente complejo ferroso hexacoordinado met-hemoCD3-Fe^{II}(O₂) y la liberación de radicales HS[•]. En forma análoga, usando CO, el complejo met-hemoCD3-Fe^{III}(SH⁻) rinde met-hemoCD3-Fe^{II}(CO) y HS[•]. Este resultado es en cierta forma inesperado, ya que el CO es capaz de reaccionar con hierro ferroso y no con férrico. Ambos experimentos dan cuenta de la presencia de la resonancia [Fe^{III}(SH⁻) $\leftrightarrow$ Fe^{II}(SH[•])], que ha sido propuesta como iniciadora de la descomposición oxidativa de sulfuro mediada por HbFe^{III} y MbFe^{III}.^{141,174,184}

Efecto del pH – Especiación de sulfuro y migración al sitio activo.

Teniendo en cuenta que las propiedades generales de las especies H₂S y HS⁻ difieren, es de esperar que su capacidad de unirse a hemoproteínas también lo haga. Como ambas

especies son accesibles en un entorno de pH fisiológico, la participación de cualquiera de ellas podría ser considerada en el estudio de la coordinación. Para clarificar el panorama, han sido reportados distintos estudios del comportamiento cinético del sulfuro frente a hemoproteínas en función del pH. Tales son los ejemplos de hemoglobinas I, II y III de *Lucina pectinata*,¹⁸¹ hemoglobina de *Vitreoscilla*,¹⁸² hemoglobina humana y porcina,^{174,195,200} mioglobina,^{141,174} y neuroglobina. En estos estudios han sido explorados diferentes rangos de pH, que se comprenden entre 5.5 y 9.0 dependiendo del sistema. Los rangos elegidos en cada caso obedecen a que el sistema hémico y su entorno, es decir, residuos proteicos protonables, no presenten modificaciones debidas a protonación o desprotonación, con la consecuente modificación de su reactividad intrínseca. Con intrínseca nos referimos a la reactividad individual que muestran H_2S y HS^- , que contribuirían en distinta medida dependiendo del pH, que determina la proporción de cada uno. A partir de los estudios sobre la coordinación en función del pH han sido reportadas constantes cinéticas intrínsecas para la especie neutra H_2S .^{143,174,197}

Los estudios realizados con distintas globinas concuerdan en que a pH más ácido la coordinación es más rápida, y que a los pH más alcalinos la velocidad del proceso disminuye significativamente. En el caso de la mioglobina, el ajuste de la velocidad de la reacción en función del pH arroja un valor para la constante intrínseca de HS^- que tiende a cero. La conclusión general en estos casos es que H_2S es la especie que efectivamente se coordina a la hemoproteína, considerando que HS^- pareciera inerte.^{9,143}

No obstante, cuando se realizó un estudio similar con $\text{NACMP11Fe}^{\text{III}}$ se observó una tendencia opuesta con mayor velocidad de unión frente al aumento del pH. La constante cinética intrínseca para la unión de HS^- era mayor que para H_2S , siendo esta última no nula.^{9,143} Los resultados experimentales se observan en la figura 1.11.

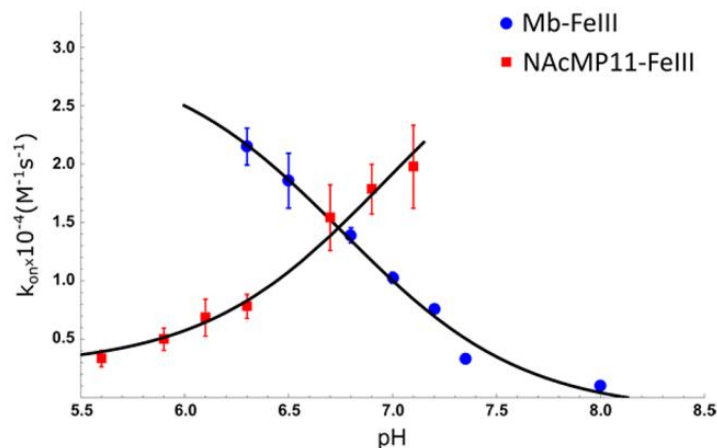


Figura 1.11. Constante cinética k_{on} en función del pH para la reacción de MbFe^{III} (azul) o NAcMP11-Fe^{III} (rojo) con Na₂S. Extraído de Boubeta et al. (2018).¹⁴³

La interpretación teórica apunta a diferencias en la esfera de solvatación, mucho más lábil para H₂S que para HS⁻. El uso de cálculos de dinámica molecular clásica permitió proponer una interpretación al respecto.^{143,197} La energía libre asociada a la migración de H₂S y HS⁻ fue evaluada por medio de dinámica molecular guiada (sMD, *steered Molecular Dynamics*), para Hb I de *Lucina pectinata* y para MbFe^{III} de corazón equino.^{143,197} La fuerte interacción entre el anión HS⁻ y las moléculas de agua de solvatación dificulta su migración por el canal de la mioglobina, imponiendo una barrera energética de 7 kcal/mol, mientras que su conjugado neutro presenta una barrera de 1 kcal/mol, para el caso de la MbFe^{III},¹⁴³ En el caso de la NAcMP11Fe^{III}, como se mencionó antes, no existen restricciones de migración y la esfera de solvatación del anión no impide su acceso de forma significativa. La comparación de los perfiles de energía libre para los procesos de migración y las estructuras de los ligandos con su esfera de solvatación se pueden observar en la figura 1.12.

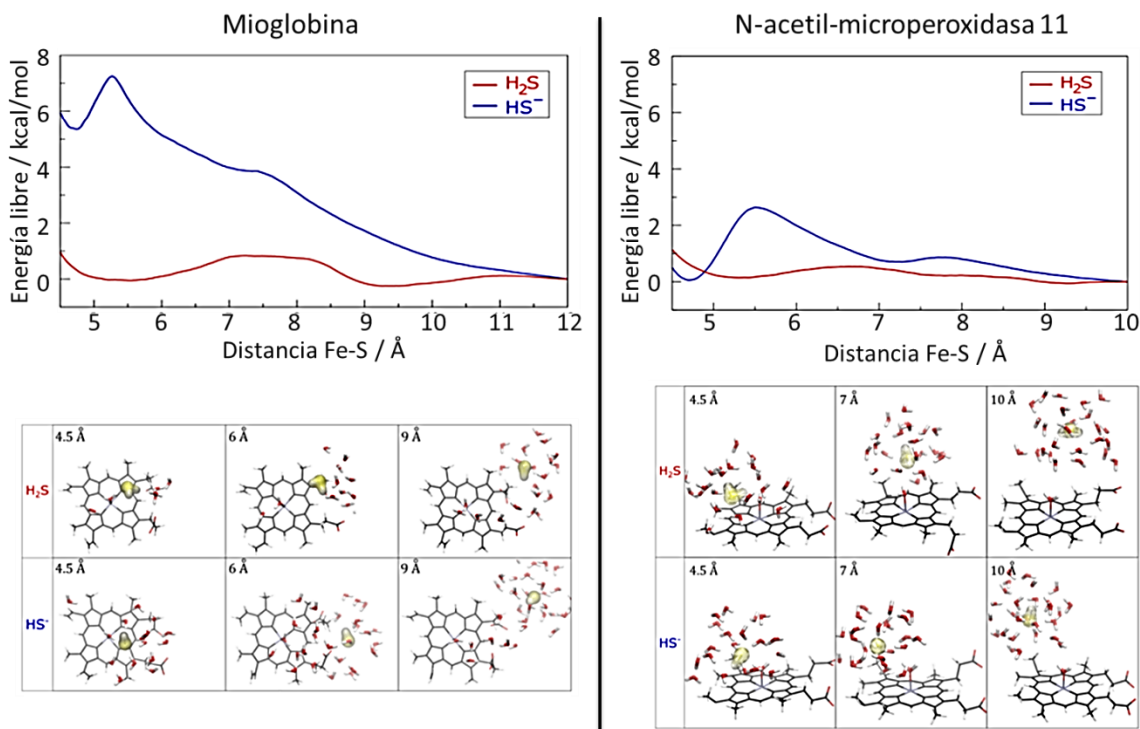


Figura 1.12. Evaluación computacional de la migración de H₂S y HS⁻ a través de la puerta E7 de MbFe^{III} y de la migración de H₂S y HS⁻ para coordinarse a NAcMP11Fe^{III}. Arriba, perfiles de energía libre obtenidos por el método de Jarzynski para H₂S (rojo) y HS⁻ (azul) en función de la distancia interatómica entre Fe y S. Abajo, estructuras representativas de dinámica molecular guiada a distintas distancias de la coordenada de reacción para ambas proteínas y ambos ligandos. Se representa el grupo hemo, el ligando y la esfera de solvatación de agua. Todos los paneles son adaptados de Boubeta et al. (2018).¹⁴³

El proceso de coordinación puede ser separado en dos pasos consecutivos. Un primer paso de migración del ligando desde el solvente hasta el sitio activo, y un segundo paso de formación efectiva del enlace Fe-S. Las medidas experimentales de k_{on} , al ser basadas principalmente en absorción UV-Visible, sólo detectan la modificación que sufre el hemo por el cambio del ligando, y engloban ambos pasos.

Como ya fue mencionado, la similitud de los valores de k_{on} de distintas HPs sugiere que sus mecanismos de unión son mayoritariamente disociativos, es decir, dependientes de la separación del H₂O como ligando en primera instancia. No obstante, las variaciones

alrededor del valor de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sugieren que la contribución de mecanismos asociativos es variable en las distintas proteínas.

A diferencia de lo observado en HbFe^{III} y MbFe^{III} , en el caso de la $\text{NACMP11Fe}^{\text{III}}$ la ausencia de una matriz proteica ha permitido poner en evidencia la reactividad intrínseca de HS^- , debido a la falta de restricciones para acceder al sitio de unión.¹⁴³ El mecanismo de unión del anión HS^- a la microperoxidasa se vería favorecido por su mayor nucleofilia.

Las especies férricas que no son hexacoordinadas por la proteína suelen tener H_2O como ligando distal. La propuesta de un mecanismo disociativo para la unión de sulfuro implica la salida de la molécula de H_2O coordinada a la posición distal. Si se utiliza la ecuación de Eyring (ecuación 1.1) para estimar la energía de la unión de H_2O a partir de $k_{\text{off}}(\text{H}_2\text{O}) = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ como paso controlante, el resultado es aproximadamente de 12 kcal/mol. Ese valor concuerda con la energía libre de interacción de una molécula de agua coordinándose con un sistema de porfirina férrica.^{202,203}

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G^\ddagger/RT) \quad (\text{ec. 1.1})$$

Un análisis cinético experimental realizado sobre mutantes de Lp-Hbl reporta cambios de un orden de magnitud en k_{on} , tanto en aumento como disminución. La inclusión de aminoácidos que proveen interacciones de puente de hidrógeno dentro de la cavidad distal parece estabilizar al H_2O coordinada, disminuyendo k_{on} de H_2S . Por el contrario, reemplazar un residuo polar por otro hidrofóbico causa el efecto opuesto. Otros trabajos han hecho un abordaje similar con hemoglobina truncada de *Thermobifida fusca*, llegando a conclusiones similares.^{183,204} Estas evidencias implican que el entorno del grupo prostético también es un factor crucial en la reactividad de una hemoproteína.

1.4.2 Reactividad química de los complejos de HPs y H_2S

En cuanto al destino del complejo una vez formado, tanto $\text{HbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, $\text{NgbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ como otras hemoglobinas o hemoproteínas en general (ej. citocromo c,¹⁹³ mieloperoxidasa,¹⁸⁵) ha sido propuesto que tienen tendencia a dar la reducción de la

proteína, con formación de radicales HS• por oxidación de HS⁻ coordinado (reacción 1.55).^{141,174,184}

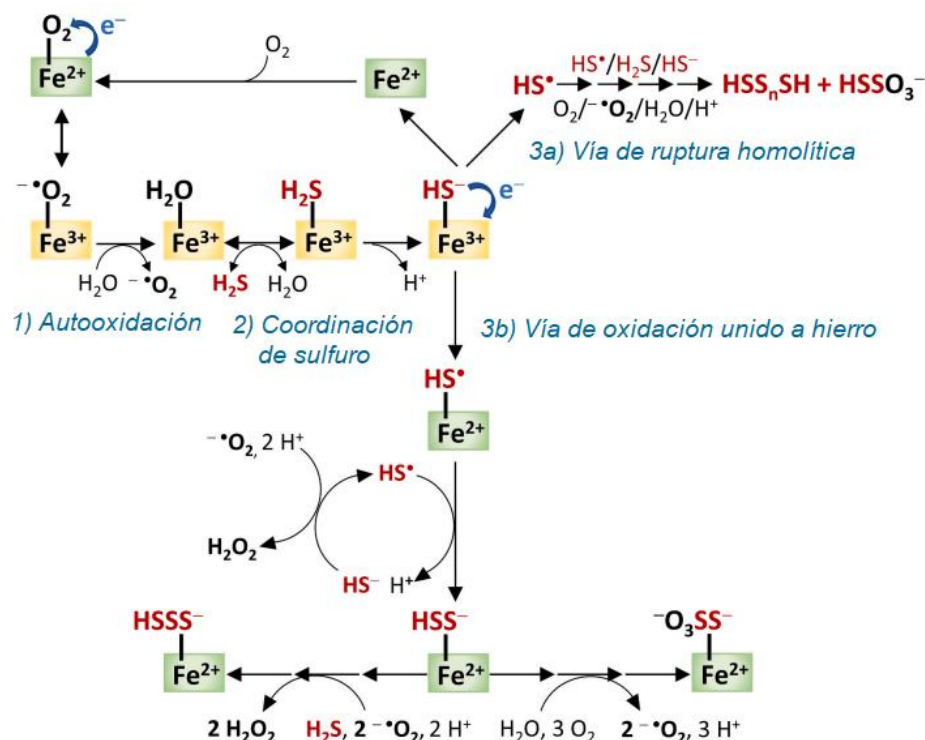


Este proceso rédox del complejo es lento en los casos mencionados, con tiempos del orden de 1 a 2 horas. Para el caso de la neuroglobina, ha sido desestimada su factibilidad *in vivo*.¹⁸⁸

Es relevante reconocer que, en términos del mecanismo subsiguiente, las formas Fe^{II}(SH•) podrán ser capaces de seguir reaccionando en la forma unida, o bien podrán liberar a la especie radicalaria. A su vez, el radical podrá permanecer en la matriz proteica, o alcanzar el bulk. Este destino de las formas Fe^{II}(SH•) depende de las características de la hemoproteína, la posibilidad de homólisis para dar Fe^{II} y HS•, de los canales de salida desde el sitio activo al medio, y de la posibilidad de residencia en la proteína. Para el caso del citocromo c, fue demostrado que el radical sulfanilo formado a partir del complejo cyt c-Fe^{III}(SH⁻) es capaz de persulfidar albúmina humana.¹⁹³

Los productos de oxidación del sulfuro dependen de la presencia o ausencia de O₂. En condiciones anóxicas ha sido reportada la formación de polisulfuros (HS_n⁻) unidos a la forma ferrosa como producto azufrado final, mientras que en condiciones aeróbicas el producto mayoritario es tiosulfato, S₂O₃²⁻, y además puede formarse sulfito, SO₃²⁻.^{141,184,188} Aunque el tiosulfato ha sido recientemente propuesto como un metabolito de relevancia biológica y potencial terapéutico,²⁰⁵ en el contexto de la reacción de sulfuro con hemoproteínas es considerado un producto de la detoxificación oxidativa del sulfuro.

En base a múltiples evidencias experimentales y teóricas, fueron propuestos mecanismos en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Las propuestas mecanísticas más detalladas en la literatura pertenecen a trabajos de reactividad de H₂S frente a MbFe^{III} o HbFe^{III}.^{141,184} Los trabajos consisten en la caracterización de la cinética de los procesos de coordinación,^{143,174} la identificación de productos de oxidación del sulfuro,^{184,200} del estado final de las proteínas y la propuesta de pasos de terminación. Las propuestas mecanísticas para HbFe^{III}^{184,200} y MbFe^{III} se presentan en el esquema 1.11 y fueron incluidas en un trabajo de revisión reciente.⁸



Esquema 1.11. Propuestas mecanísticas reportadas para la reactividad entre globinas y sulfuro. Extraído de Domán et al. (2023).⁸ Las reacciones presentadas no se encuentran balanceadas por simplicidad.

Sin embargo, los autores sostienen que el mecanismo todavía conserva vacancias y no está totalmente claro, como fue mencionado en la sección 1.3.2.^{8,174} En la literatura, han sido propuestos tanto mecanismos de esfera interna como de esfera externa. Los mecanismos de esfera interna se sostienen en la hipótesis de que la reducción de los complejos tipo Fe^{III}(SH⁻) dependen de una homólisis reductiva,^{174,175,195} mientras que los mecanismos de esfera externa proponen que la reacción no se produce por una homólisis espontánea del complejo, sino que puede ser llevada a cabo por el H₂S externo.^{174,188}

Para la HbFe^{III}, la presencia de concentraciones sub-estequiométricas de H₂S lleva una velocidad de reducción decreciente con el aumento de la concentración de H₂S. Esta relación inversa no ha sido explicada aún.¹⁷⁴ Las autoras sostienen que la participación de un equivalente externo de H₂S en el proceso de reducción no sería consistente con un mecanismo de esfera externa, debido a que la tendencia de la velocidad de reducción del

centro metálico en función de la concentración de Na_2S total debería ser creciente, y no a la inversa como observaron experimentalmente.¹⁷⁴

Por lo dicho, los aspectos mecanísticos de las reacciones de sulfuro con hemoproteínas deben ser abordados teniendo en cuenta las características particulares de la proteína en estudio, y las condiciones de reacción.

1.4.3 Relevancia biológica de las interacciones de hemoproteínas con H_2S

Han sido propuestos distintos roles para la actividad de hemoproteínas frente a H_2S . Estos roles o funciones biológicas se asignan teniendo en cuenta las concentraciones endógenas, características de los tejidos en que se encuentran y la reactividad que muestran.

El H_2S , como se mencionó en la sección 1.1.1, inhibe reversiblemente a la CcO, y por lo tanto la cadena respiratoria mitocondrial. Dicho proceso, por un lado puede resultar en un mecanismo tóxico cuando la inhibición es total, pero por otro lado puede tener un rol regulatorio si la inhibición es parcial. Ha sido propuesto que la inhibición parcial reversible de la CcO es un mecanismo de señalización endógena vía la acumulación de coenzima Q_{10} reducida.

Las Hb de *L. pectinata*, de alta afinidad por H_2S , tienen asignado un rol posible de transporte. Esto cobra sentido en el contexto de las simbiosis observadas entre organismos que poseen estas HPs y microorganismos quimioautótrofos que utilizan sulfuro como parte esencial de su metabolismo energético. A cambio, los microorganismos proporcionan al huésped nutrientes que se derivan de este metabolismo. Este comportamiento simbiótico es observado en otros moluscos, como por ejemplo *Chrysomallon squamiferum*, un gastrópodo que vive en fuentes hidrotermales marinas, y sobrevive en entornos con alto contenido de sulfuro.²⁰⁶ En la bacteria *Vitreoscilla*, se asignan las funciones de las HPs a recepción y almacenamiento de H_2S con finalidades metabólicas.¹⁸²

La HbFe^{III} es propuesta como efectora de una función que no es su función canónica, el catabolismo de H_2S en glóbulos rojos, que carecen de mitocondria, organela en la que se da la metabolización canónica principalmente por la enzima SQOR.^{184,195}

Respecto de la $\text{NgbFe}^{\text{III}}$ se especula que posee funciones regulatorias, sobre todo en cerebro, donde su concentración es 2 órdenes más alta que en el resto del sistema nervioso, y donde se han encontrado concentraciones de H_2S , H_2S_2 y H_2S_3 significativas, postuladas como neuromoduladores.^{10,207} El estudio de esto último es dificultoso debido a la susceptibilidad del puente disulfuro de $\text{NgbFe}^{\text{III}}$ a ser reducido por las RSS,¹⁸⁸ lo cual conlleva artefactos en los estudios cinéticos *in vitro*.

1.4.4 Reacción de sulfuros sobre el anillo porfirínico: formación de sulfhemos

Además de las reacciones presentadas de coordinación y transferencia electrónica con el metal central, se conoce otro tipo de reactividad de estas especies con el grupo hemo. En condiciones particulares, el sulfuro o especies relacionadas pueden realizar un ataque nucleofílico sobre el anillo porfirínico, generando compuestos de adición, de color verde, llamados sulfhemos.

Los sulfhemos fueron descritos por primera vez en 1863, a partir de la reacción entre $\text{HbFe}^{\text{II}}\text{O}_2$ y Na_2S .²⁰⁸ Los autores observaron la formación de un compuesto verde, que atribuyeron a la adición de azufre sobre el grupo prostético. Más tarde fue reportado que la formación de sulfhemos requiere de la presencia de O_2 , como se observó también en mioglobina, en donde la formación de sulfhemos está asociada a la putrefacción de carnes.²⁰⁹

A partir de estos trabajos fundacionales, se llevaron adelante distintas investigaciones para determinar la estructura de estos compuestos de color verde, las condiciones de formación y mecanismos.

El estudio sistemático de distintos sulfhemos para determinar sus propiedades fisicoquímicas incluyó espectroscopía UV-Visible,^{186,210–212} espectroscopía IR,^{186,210–212} dicroísmo circular,²¹³ RMN ^1H y ^{13}C ,^{214,215} EPR,^{210,216} Raman,^{217–219} y estudios de MS.²¹⁵

En la sulfHb y la sulfMb , el átomo de azufre se incorpora a uno de los anillos de pirrol del hemo, lo que disminuye su afinidad por el O_2 . La naturaleza química del hemo modificado tanto en la sulfHb como en la sulfMb fue objeto de debate, con la propuesta de diversas

estructuras posibles (figura 1.13).^{210,217,220} Algunas estructuras fueron desestimadas en base a distintas evidencias espectroscópicas.

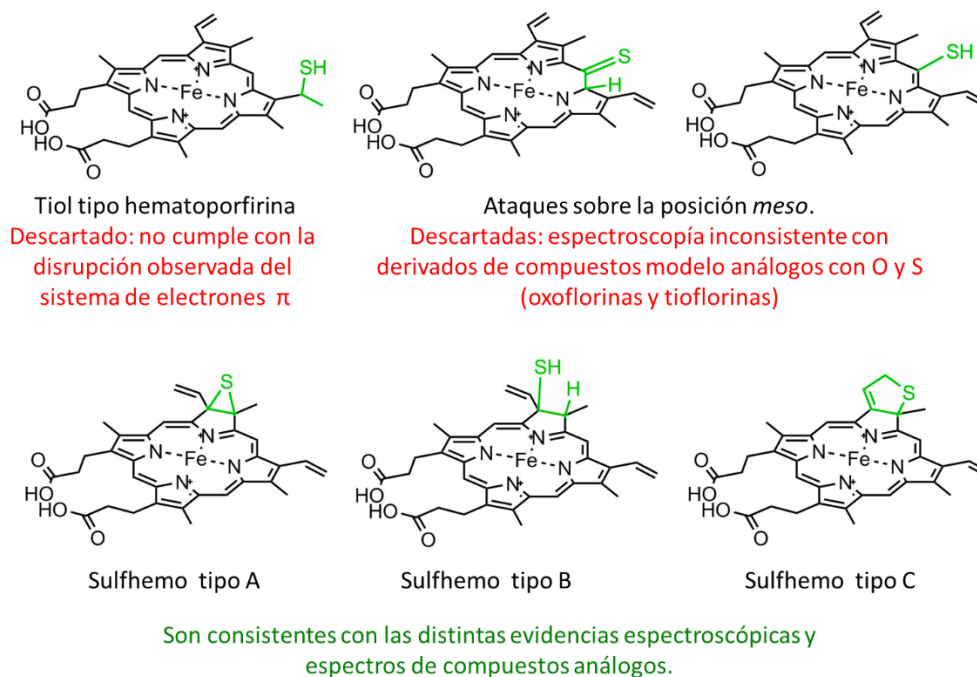


Figura 1.13. Estructuras descartadas (arriba) y estructuras aceptadas en la literatura (abajo) para las especies de sulfhemo de hemina IX. Estas modificaciones sufridas por la hemina IX incluyendo átomos agregados y enlaces modificados se muestran en verde. Adaptado de Bondoc et al. (1986)²¹⁵ y Ríos-González et al. (2014)²²⁰.

La sulfHb y la sulfMb presentan un grupo hemo modificado, en el que un átomo de azufre se incorpora al anillo b del sistema de porfirina. Experimentos de radioactividad con azufre marcado (^{35}S) permitieron determinar la estequiometría de la formación de sulfMb, que involucra la adición de sólo un átomo de S al anillo de la porfirina.^{210,215,221,222} Además del estudio de las proteínas modificadas sulfMb y sulfHb, también fueron estudiados los grupos prostéticos libres extraídos luego de la formación de sulfhemo.²²² Los autores observaron características espectroscópicas consistentes con las estructuras propuestas para los sulfhemos formados dentro de las proteínas.

Mediante estudios de RMN ^1H y ^{13}C de sulfMb fue identificado el átomo de azufre en el anillo b, analizando los desplazamientos químicos de los metilos del grupo hemo y los sustituyentes del vinilo.^{214,219,223} Al mismo tiempo, también fue reportado que no ocurren

modificaciones en el resto de la proteína, y que se trataría de una modificación exclusiva del grupo prostético.

En base a datos espectroscópicos (RMN y resonancia Raman) distintos trabajos proponen que el átomo de azufre se incorpora al doble enlace $C_\beta \backslash C_\beta$ del anillo b, ya sea como episulfuro o como tioclorina.^{210,214,215,217–219,223} Los trabajos de RMN dejan claro que la adición no es sobre el doble enlace del grupo vinilo. Las estructuras propuestas a partir del análisis espectroscópico se denominan sulfMbA,^{215,219,224,225} sulfMbB y sulfMbC para el episulfuro, el episulfuro abierto y la tioclorina respectivamente (figura 1.13). En general, los espectros de RMN de las tres formas mostraron reducción de la simetría del macrociclo porfirínico y alteración de la conjugación π del anillo b.²¹⁹

Como característica, la estructura de sulfMb tipo A, se reconvierte rápidamente al protohemo cuando el hemo se extrae de la proteína.^{215,219,224,225}

La banda a 617 nm observada en los espectros UV-Visible de sulfHb,¹⁷⁴ y sulfMb¹⁴¹ refleja la naturaleza de la estructura de clorina, por similitud con estructuras de otras clorinas reportadas.^{217,222} La estructura se caracteriza por un enlace $C_\beta \backslash C_\beta$ saturado en uno de los anillos de pirrol de la porfirina, que reduce la simetría de la porfirina hemo de D_{4h} , típica de la Hb y Mb nativas, a un sistema C_{2v} .²²⁰ Esta reducción induce una distorsión de la planaridad del macrociclo y cambios en las propiedades electrónicas del hemo, dando lugar a la activación de otras transiciones electrónicas a longitudes de onda más altas.

1.5 Reactividad de HSSH frente a hemoproteínas

La reactividad de HSSH ha sido explorada frente a tioles, como ya hemos mencionado (sección 1.1.2). En contraste, los ejemplos de reactividad de especies oxidadas de sulfuro como HSSH y RSSH frente a hemoproteínas son escasos.

Los persulfuros CysSSH, GSSH y de N-metoxicarbonil-penicilamina, NAcPenSSH, reaccionan con $MbFe^{III}$ para producir las formas $MbFe^{II}(O_2)$ o $MbFe^{II}$ en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, respectivamente (reacciones 1.56 y 1.57).²²⁶





También fue estudiada la reacción de disulfuro de S-metoxicarbonil penicilamina (MCPD, *S-methoxycarbonyl penicillamine disulfide*), un compuesto dador de NAcPenSSH.²²⁷ Se observó que produce MbFe^{II}(O₂) al reaccionar con MbFe^{III}, y cambios muy sutiles al reaccionar con MbFe^{II}(O₂) como proteína de partida; no obstante, en ambos casos los autores observaron la aparición de una banda de absorción con un máximo en 617 nm, indicativa de la formación de sulfMbFe^{II}.

Esta misma interferencia en 617 nm fue observada al reaccionar MbFe^{III} con CysSSH en condiciones aeróbicas,¹⁴¹ tentativamente interpretada como un posible complejo de coordinación. En un trabajo posterior del mismo grupo, identificaron este antecedente como la producción secundaria de sulfMbFe^{II}.²⁰⁰

La reactividad de HSSH frente a hemoproteínas está aún menos explorada que la de RSSH, con dos trabajos que estudian su reactividad con MbFe^{III} y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1, *indoleamine 2,3-dioxygenase*).^{126,227,228} En el caso de la MbFe^{III}, HSSH produjo la reducción del centro metálico en condiciones aeróbicas, también con formación de sulfMbFe^{II}.²²⁷ Dicho subproducto fue observado en ensayos de reactividad de MbFe^{III} con H₂S en presencia y ausencia de un oxidante que lo convierte en HSSH, en ambos casos en condiciones aeróbicas.

En el caso de la IDO1, se observó que HSSH y otros H₂S_n pueden coordinarse a la forma férrica y producir la reducción del centro metálico, recuperando la forma ferrosa que es la forma activa de esta proteína, cuya función es la catálisis de la oxigenación del anillo indol del triptófano, que tiene como consecuencia la inhibición de la respuesta inmune en procesos autoinmunes e inflamatorios. Más aún, los autores han observado que la k_{on} de coordinación de HSSH es alta, del orden de 10⁶ M⁻¹s⁻¹, con una afinidad del orden del μM que se condice con concentraciones relevantes de HSSH en entornos biológicos.¹²⁶ También han estudiado la interacción de H₂S con la IDO1 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Tanto H₂S como HSSH son capaces de reducir el hierro de la IDO1, aunque H₂S es mucho menos eficaz como reductor comparado con los polisulfuros. Interesantemente, en la

reducción de IDO1 mediada por H_2S observaron una fase lenta inicial al igual que las observaciones en otros trabajos con MbFe^{III} y $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$.^{141,193} La k_{on} de HSSH frente a MbFe^{III} y la cinética de la subsiguiente reducción serán objeto de estudio en la presente Tesis.

1.6 Objetivos

Nuestro objetivo general es contribuir a la interpretación de las bases moleculares de la compleja reactividad de moléculas pequeñas y endógenas frente a hemoproteínas, en virtud de su relevancia en procesos de interés biológico o patológico de microorganismos, plantas y mamíferos.

Se abordaron objetivos específicos de diferente complejidad y con resultados de distinto alcance, pero con contribución al objetivo general. En el Capítulo 1 se incluye una revisión bibliográfica de los temas a estudiar, conforme al estado del arte.

En la presente Tesis abordamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudio del comportamiento cinético de los procesos de óxido-reducción que involucran al sulfuro y al disulfuro frente a la mioglobina como modelo de hemoproteínas de la familia de las globinas. Determinación de constantes cinéticas. Propuesta de mecanismos de reacción. Control de interferentes en las determinaciones cinéticas (Capítulos 2 y 3).
- 2) Revisión, evaluación y caracterización de propiedades químicas de especies reactivas de azufre inorgánico libres de oxígeno y de interés bioquímico. Estudio de su participación como especies intermediarias en los procesos reactivos seleccionados (Capítulo 2).
- 3) Evaluación de datos cinéticos reportados sobre un proceso reactivo de interés, como es la carbonilación reductiva de grupos hemo. (Capítulo 4).

2. La reducción de MbFe^{III} mediada por sulfuro en condiciones anóxicas

La coordinación de H₂S/HS⁻ sobre MbFe^{III}, como se mencionó en la sección 1.4.1, es rápida y se obtiene el complejo MbFe^{III}(SH⁻). Esta especie puede sufrir distintas transformaciones dependiendo de las condiciones del medio y de los reactivos disponibles.

En condiciones aeróbicas ha sido reportada la formación de polisulfuros, sulfito y tiosulfato como productos de la oxidación del sulfuro coordinado, con la concomitante reducción de MbFe^{III} a MbFe^{II}.¹⁴¹ De esta forma, la MbFe^{II} quedaría disponible para coordinarse con el O₂, en su función canónica. En presencia de especies reactivas del oxígeno generadas como productos de reacción fue propuesta la formación de complejos ferrosos con polisulfuros coordinados, MbFe^{II}(SSH⁻), MbFe^{II}(SS_nH⁻), o también la formación de tiosulfato coordinado, MbFe^{II}(SSO₃²⁻), como destino final del azufre.^{141,200} Además, ha sido reportada la formación de subproductos de adición de azufre sobre el anillo porfirínico del grupo hemo.^{141,174}

En el presente trabajo de Tesis hemos optado por trabajar en condiciones anóxicas, en rigor, bajo atmósfera de gas inerte, para reducir la cantidad de variables del problema y estudiarlo mecanísticamente. En condiciones de hipoxia, la contribución de un mecanismo en estas condiciones podría volverse significativa. Algunos tejidos en mamíferos son inherentemente hipóxicos. Por ejemplo, en ratas se observa que mientras que en la circulación arterial la tensión de O₂ (pO₂) se encuentra cercana a los 104 mmHg (146 μM), los tejidos con baja vascularización presentan valores mucho más bajos. En particular, en cerebro fueron medidas pO₂ de entre 0.4 y 8.0 mmHg (entre 0.05 y 1 μM) según la región cerebral.²²⁹

Interesantemente, en ciertos tejidos hipóxicos no sólo la concentración de O₂ es baja sino que también se observa una mayor concentración de H₂S,²³⁰ debido a su menor tasa de descomposición. Esto es porque la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra reducida, y no hay suficiente coenzima Q₁₀ oxidada como cofactor para la SQOR. El H₂S generado resulta un mecanismo de protección frente a la apoptosis inducida por ROS en hipoxia.²³¹

Los organismos adaptados a condiciones hipóxicas presentan un aumento en la capacidad metabólica de oxidar el H_2S generado.²³⁰

También, es de interés mencionar que ciertos tejidos tumorales resultan hipóxicos en comparación con el mismo tejido sano debido a que el rápido crecimiento conlleva una deficiente vascularización.²³² Las formas de cáncer recurrente y más agresivo están asociadas a bajas tensiones de oxígeno. En estos casos, la Mb ha sido identificada en el crecimiento de los tumores y la metástasis. La expresión regulada de Mb ha sido reconocida en cáncer de pulmón, próstata y mama.²³³ Evidencias recientes sugieren que la expresión de Mb está regulada directamente por la hipoxia y podría contribuir a una reconfiguración metabólica en tejidos tumorales.²³⁴ Estas mioglobinas se denominan mioglobinas ectópicas por su inesperada localización. En un trabajo muy reciente sobre la función de mioglobina en tejido adiposo marrón, los autores señalan que la historia completa de la mioglobina todavía debe ser contada, ya que aún hay mucho para aprender sobre ella y sus múltiples aspectos funcionales.²³⁵

2.1 Cinética de la reacción entre MbFe^{III} y Na_2S

El estudio de la cinética de la reacción entre MbFe^{III} y soluciones de Na_2S se llevó a cabo en condiciones anóxicas, a distintos pH, y variando las concentraciones iniciales de Na_2S . Los detalles experimentales se encuentran en la sección 2.5.1. Se utilizaron concentraciones de Na_2S en exceso en todos los experimentos. De aquí en adelante se utilizará la notación $R_{\text{S/Fe}}$ para referir al cociente entre la concentración de sulfuro sobre la concentración de mioglobina. Por ejemplo, en un experimento con $[\text{Na}_2\text{S}]_0 = 1000 \mu\text{M}$ y $[\text{MbFe}^{\text{III}}]_0 = 10 \mu\text{M}$, se notará $R_{\text{S/Fe}} = 100$. Para todos los experimentos, la concentración de sulfuro inicial se puede calcular como $[\text{Na}_2\text{S}]_0 = R_{\text{S/Fe}} \times 10 \mu\text{M}$. Procuramos trabajar en condiciones de pseudo orden utilizando concentraciones relativamente altas de Na_2S .

En la Figura 2.1 pueden observarse los cambios espectroscópicos luego de agregar solución de Na_2S a MbFe^{III} a pH 7.4, en atmósfera de argón, a 25°C y con $R_{\text{S/Fe}}=100$.

Se observa la rápida formación de un intermediario con una banda de Soret en 428 nm y bandas Q en 545 y 578 nm, consistente con el espectro reportado para el complejo

$\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$,^{143,174} que luego cambia lentamente hacia un producto con una banda de Soret en 434 nm y una única banda Q centrada en 556 nm, consistente con el espectro de la mioglobina ferrosa pentacoordinada, MbFe^{II} .^{141,174}

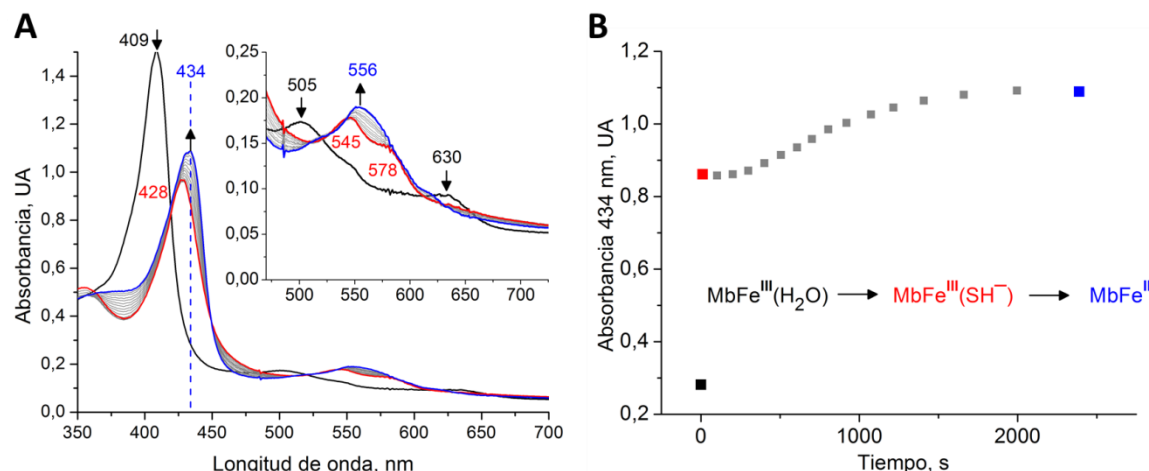


Figura 2.1. Reacción de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ 8 μM con 100 equivalentes de Na_2S en condiciones anóxicas, 25°C, en buffer fosfato pH 7.4. (A) Cambios del espectro UV-Vis. Se muestra el espectro inicial (negro, t_0), intermediario (rojo, $t = 1.4$ s), final (azul, $t = 2400$ s) y espectros intermedios (gris). (B) Traza cinética correspondiente a $\lambda = 434$ nm. Los colores se corresponden con los espectros del panel A.

Lo mismo se observa para $R_{\text{S/Fe}}$ desde 50 hasta 600. Para valores menores de $R_{\text{S/Fe}}$ se pueden registrar espectros con contribuciones mixtas en equilibrio de MbFe^{III} inicial e intermediario (figura 2.2), pero alcanzan el mismo producto final en todos los casos.

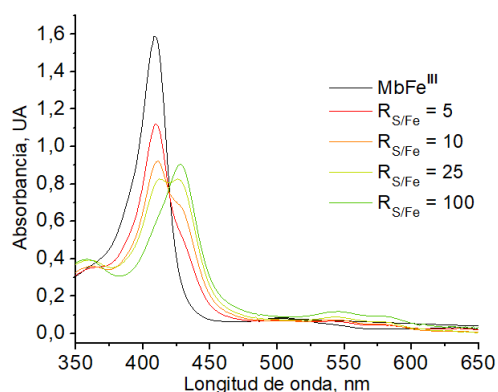
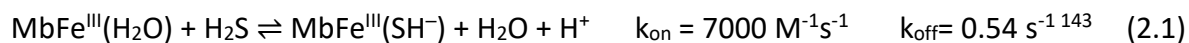


Figura 2.2. Cambios espectroscópicos de MbFe^{III} al alcanzar el equilibrio de coordinación. $R_{\text{S/Fe}} = 5$, 10, 25 y 100 (rojo, naranja, amarillo y verde respectivamente). El espectro negro corresponde a la MbFe^{III} de partida.

Las soluciones de Na₂S en el rango de pH de trabajo (6 a 8) darán lugar a la presencia de H₂S y HS⁻ en distintas proporciones en base al pK_{a1} del H₂S. Teniendo en cuenta que la reacción reportada para la interacción entre MbFe^{III}(H₂O) y H₂S es la coordinación (reacción 2.1), el primer cambio rápido de la banda de Soret es el esperado. Las constantes cinéticas reportadas para el proceso de coordinación fueron obtenidas en estudios cinéticos previos, en condiciones anóxicas.¹⁴³



La cinética del segundo paso lento se caracteriza por una traza cinética de crecimiento de la banda a 434 nm, de forma sigmoidea en función del tiempo, es decir que inicialmente se forma producto en forma lenta, luego se acelera su formación, y finalmente se desacelera a medida que la reacción se completa (figura 2.1, panel B). A partir de aquí, para la reducción de MbFe^{III} mediada por sulfuro, se analizará la traza cinética sigmoidea, que tiene como punto de partida el complejo MbFe^{III}(SH⁻) cuya formación ocurre en el orden de segundos, mientras que la reducción a MbFe^{II} toma desde minutos a horas, dependiendo de las concentraciones iniciales.

De acuerdo con la literatura, tanto para el caso de MbFe^{III} como para otros ejemplos de hemoproteínas o modelos, el sulfuro coordinado puede oxidarse por un electrón y convertirse en radical sulfanilo HS[•]/S^{•-} con el hierro férrico como oxidante (Reacción 2.2).^{141,174,185,193} Nótese que sugerimos que el radical podría existir en ambos estados de protonación a pH fisiológico.



Los cambios en el espectro por conversión del intermediario MbFe^{III}(SH⁻) en el producto final MbFe^{II} presentan un punto isobéptico en 449 nm (figura 2.3), que en principio sugiere que no se acumulan intermediarios en el proceso, tal como fue reportado anteriormente.¹⁴¹

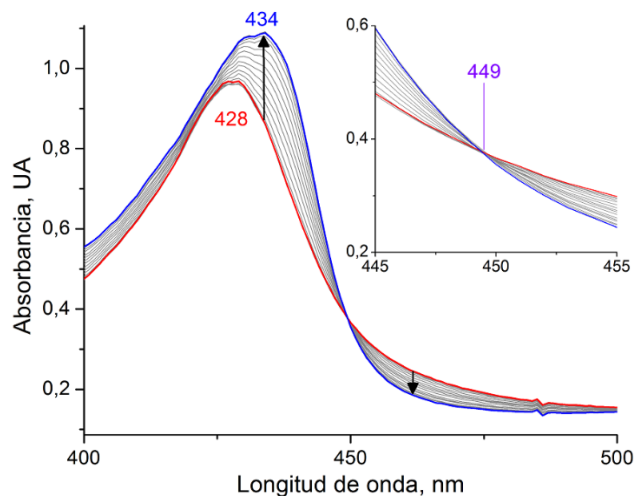


Figura 2.3. Conversión de $MbFe^{III}(SH^-)$ a $MbFe^{II}$. Espectro inicial y final en rojo y azul respectivamente. La ampliación muestra la zona de 445 a 455 nm en donde se ubica un punto isobéptico, a 449 nm.

El espectro final observado en los experimentos coincide con el obtenido por reducción de $MbFe^{III}$ en atmósfera de argón con ditionito de sodio ($Na_2S_2O_4$) o con borohidruro de sodio ($NaBH_4$), con bandas en 434 y 556 nm, correspondientes a $MbFe^{II}$.

Para el seguimiento cinético de esta reacción fueron seleccionadas las bandas del producto reducido, 434 y 556 nm. Ambas bandas son válidas, ya que los perfiles de absorbancia en función del tiempo son similares (figura 2.4) y ajustan con parámetros similares, con una diferencia menor al 1% ($t_{50} = 801$ y 794 segundos, para $\lambda = 434$ y 556 nm respectivamente). Por las concentraciones empleadas y la posición de la banda, resultó conveniente el uso de la banda más intensa.

Para unificar la representación de las trazas cinéticas, se define ΔA como la variación de absorbancia a una determinada longitud de onda para representar la evolución en función del tiempo con una variable normalizada (ecuación 2.1). Esta nueva variable se utilizará en el eje de ordenadas.

$$\Delta A = (A_t - A_\infty) / (A_0 - A_\infty) \quad (\text{ec. 2.1})$$

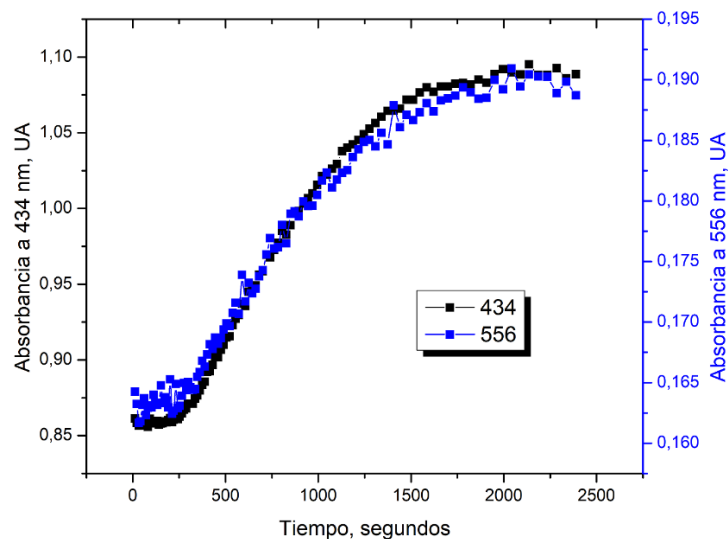


Figura 2.4. Traza cinética comparativa del valor de absorbancia a 434 nm (negro) y 556 nm (azul). $MbFe^{III}(H_2O)$ 8 μM por agregado de 100 equivalentes de Na_2S en condiciones anóxicas, 25°C, en buffer fosfato pH 7.4.

Al representar ΔA a 434 nm en función del tiempo observamos que en todos los experimentos los datos seguían una curva en forma de S, o sigmoidea. Los valores A_∞ y A_0 en estas condiciones son valores asintóticos al inicio y al final de la reacción. Las trazas cinéticas de estas características sugieren un mecanismo complejo.

2.1.1 Cinética sigmoidea: hipótesis de autocatálisis

El ajuste de las trazas sigmoideas por medio de funciones logísticas (ecuación 2.2), de origen fenomenológico, resulta adecuado para analizar los perfiles cinéticos obtenidos, ya que permite el ajuste de los datos experimentales.

$$A_t = A_\infty + \frac{A_0 - A_\infty}{1 + (t/c)^a} \quad (\text{ec. 2.2})$$

En la ecuación precedente a es el parámetro de pendiente, y cuanto más alto es, mayor es la pendiente en el punto de inflexión de la curva; c es el parámetro que corresponde a la coordenada abscisa del punto de inflexión y es interpretado como el tiempo de vida media del proceso global cuando la abscisa es el tiempo; A_0 es la asíntota al valor inicial, y A_∞ es la asíntota cuando el tiempo tiende a infinito.

La asimetría que presentan las curvas hace que el ajuste de funciones logísticas convencionales presente errores apreciables en ambos extremos asintóticos. La adición de un quinto parámetro, que da cuenta de la asimetría (ecuación 2.3), mejora notablemente el ajuste de los datos experimentales (figura 2.5).

$$A(t) = A_{\infty} + \frac{A_0 - A_{\infty}}{[1 + (t/c)^a]^b} \quad (\text{ec. 2.3})$$

Donde b es el parámetro de control, que le otorga asimetría a la función logística.²³⁶ Llamaremos 4PL y 5PL a las funciones logísticas de 4 y 5 parámetros, respectivamente.

Un parámetro de interés en el estudio cinético de estos sistemas es el tiempo característico de la curva logística, t_{50} o EC_{50} . Es el tiempo en el cual la conversión se ha completado al 50%. En el modelo 5PL se calcula conforme la ecuación 2.4.

$$t_{50} = c \cdot (2^{1/b} - 1)^{1/a} \quad (\text{ec. 2.4})$$

Cuando el parámetro de control $b = 1$, el tiempo de conversión media es igual a t_{50} ,²³⁶ y la función es simétrica.

En la figura 2.5 se observa que los valores residuales del ajuste de la función 5PL son de menor magnitud que los del ajuste de la función 4PL. La mayor dispersión de datos residuales de la función 4PL aparece en los extremos del intervalo temporal.

Adicionalmente, los primeros puntos de estas curvas son ajustados razonablemente por funciones monoxponenciales crecientes, según la ecuación 2.5.

$$A(t) = A_0 + B (e^{kt} - 1) \quad (\text{ec. 2.5})$$

Donde A_0 es la absorbancia inicial, B es la amplitud, k es la constante cinética observada de crecimiento exponencial y t es el tiempo en segundos. Bajo las condiciones de contorno, cuando $t=0$, $A(t)=A_0$.

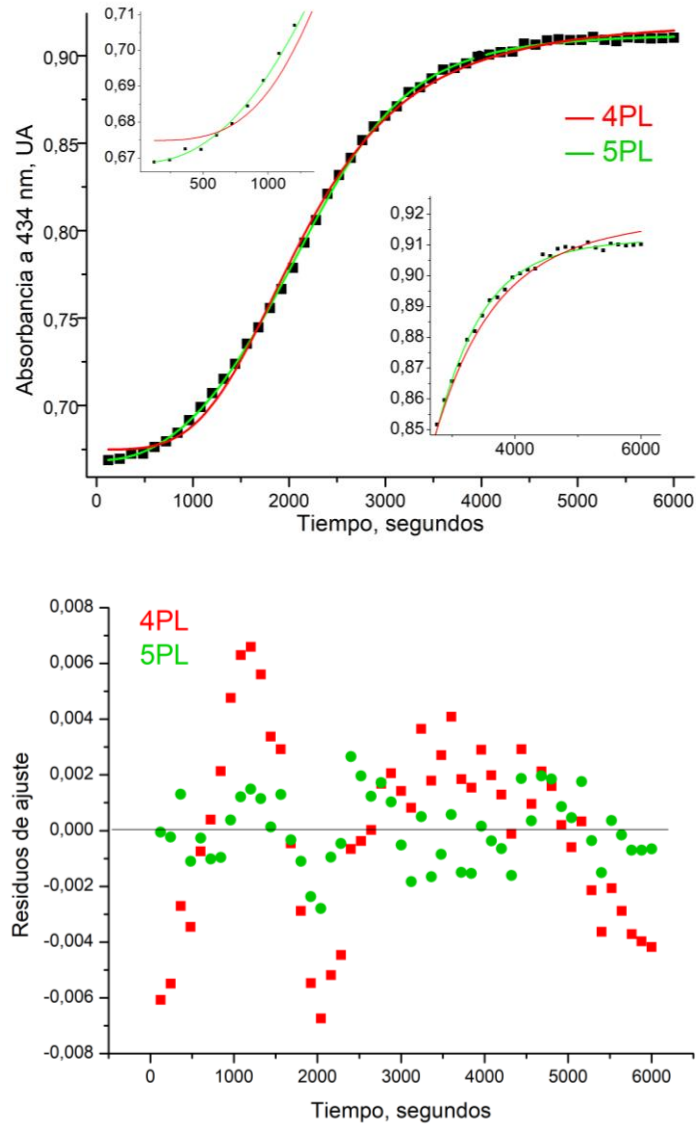


Figura 2.5. Arriba, traza cinética sigmoidea representativa de absorbancia a 434 nm para el agregado de Na_2S sobre MbFe^{III} . Datos de absorbancia en cuadrados negros, ajustes en línea continua para funciones 4PL (rojo) y 5PL (verde); abajo, valores residuales para los ajustes 4PL (cuadrados rojos) y 5PL (círculos verdes).

La figura 2.6 muestra una traza representativa del crecimiento inicial en un experimento con $R_{\text{S/Fe}} = 100$. En la figura 2.7 se muestran trazas representativas de los experimentos realizados con otras relaciones de concentración $R_{\text{S/Fe}}$.

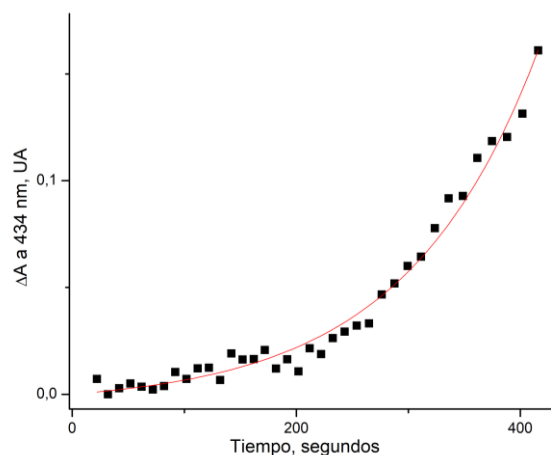


Figura 2.6. Constante de velocidad observada (k_{obs}) derivada del ajuste monoexponencial de los primeros pasos de la reacción de $MbFe^{III}$ y Na_2S , pH 7.4, 25°C. Absorbancias normalizadas a 434 nm para $R_{S/Fe} = 100$ en función del tiempo (puntos negros) y ajuste monoexponencial (línea roja).

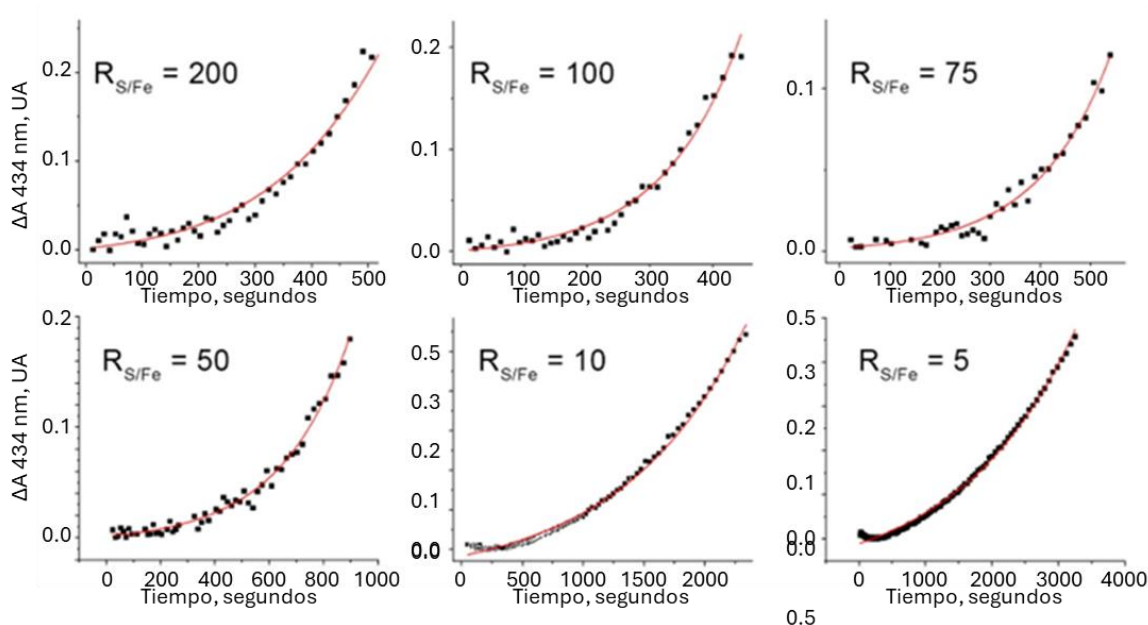


Figura 2.7. Constante de velocidad observada (k_{obs}) derivada del ajuste monoexponencial de los primeros pasos de la reacción de $MbFe^{III}$ y solución de Na_2S , pH 7.4, 25°C. Absorbancias normalizadas a 434 nm para $R_{S/Fe} = 5, 10, 50, 75, 100, 200$ (ordenadas) en función del tiempo (líneas negras discontinuas) y ajuste monoexponencial (líneas rojas continuas).

Existen distintos tipos de reacciones químicas que presentan una velocidad de reacción creciente. Se conocen numerosos ejemplos en los que el producto sólo aparece en concentraciones considerables tras un cierto retraso inicial denominado "período de

inducción". Un artículo de opinión propone hacer una distinción entre distintos mecanismos que pueden llevar a un comportamiento similar, dado el abuso que se observa sobre el uso del término "reacción reloj" que sólo es uno de los casos que muestran este comportamiento.²³⁷ Los casos en los que se ve un aumento de la velocidad de formación de un producto luego de un tiempo determinado son las siguientes:

1) Las reacciones reloj por consumo de sustrato, en las que se observa el producto (P) luego de un período de inducción (tiempo de Landolt), en el cual se consume un sustrato (C) que reacciona rápidamente con este.²³⁸



2) Las reacciones consecutivas con retraso, cuyo producto final (P) aparece en función de la acumulación de un intermediario (B). La forma sigmoidea o no de aparición de P dependerá de la magnitud relativa de las constantes cinéticas de ambos pasos elementales. Ninguna de las dos constantes cinéticas debe ser mucho más grande que la otra, porque en ese caso se observa un comportamiento exponencial a la velocidad del paso limitante.



3) Las reacciones en cadena ramificadas, que multiplican la cantidad de portadores en cada paso de reacción y así aumentan su velocidad.



4) Las explosiones térmicas, que por aumento de la temperatura modifican la constante de velocidad de un proceso en un sistema cerrado adiabático.

5) Las reacciones autocatalíticas, cuyos productos aceleran de alguna manera la misma reacción.²³⁷



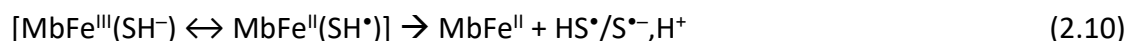
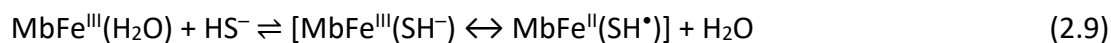
En cuanto a nuestro sistema, y la aparición de MbFe^{II} como producto, en primer lugar, descartamos la explosión térmica ya que los experimentos se realizaron a temperatura constante. En segundo lugar, descartamos la reacción en cadena ramificada, ya que la reducción de hemoproteínas no involucra portadores de radicales. En tercer lugar, descartamos la reacción reloj por consumo de sustrato, puesto que no existe un tercer reactivo que consuma el producto observado en una reacción rápida. Se supone que, al consumirse completamente el reactivo competitivo, se debe observar una aparición repentina del producto. Los perfiles iniciales de la cinética son exponenciales, con una aparición paulatina de la señal en 434 nm (figuras 2.6 y 2.7).

En cuarto lugar, la propuesta de dos reacciones consecutivas con retraso podría ser plausible. No obstante, la medición de las trazas cinéticas parte desde el complejo $[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)]$ que se forma rápidamente. El paso siguiente es la transferencia electrónica del sulfuro al hierro, formando MbFe^{II} , el producto final observado. La observación de un punto isobéptico en la conversión de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ a MbFe^{II} sugiere que la misma ocurre en un paso elemental.

Por último, y en contraste con lo anterior, las evidencias experimentales son consistentes con la hipótesis de autocatálisis. La forma en que crece la velocidad de aparición del producto MbFe^{II} es exponencial, lo cual es una característica que muestran los sistemas autocatalíticos.²³⁹ Junto con la aparición inicial lenta de MbFe^{II} , se formaría $\text{HS}^{\bullet}$, que es un radical muy reactivo. Consideramos que esta especie reactiva da origen a una especie que acelera la velocidad de reacción, y que resulta responsable del mecanismo autocatalítico.

La sigmoidicidad de las trazas cinéticas de reducción por H_2S fue observada en condiciones aeróbicas y a pH fisiológico para MbFe^{III} ,¹⁴¹ y para cyt c férrico,¹⁹³ tanto en el seguimiento cinético del consumo de H_2S , como de la formación de especies de S sulfano, tiosulfato, y la proteína reducida. Nosotros observamos este mismo comportamiento en atmósfera de argón, condición en la cual el hierro en estado férrico es el único oxidante disponible para el H_2S .

Ha sido propuesta una transferencia parcial de carga en varios complejos tipo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.^{175,176} Particularmente en la metmioglobina, el complejo puede reescribirse como una combinación de dos formas resonantes $[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-) \leftrightarrow \text{MbFe}^{\text{II}}(\text{SH}^\bullet)]$. En virtud de esto, las reacciones 2.1 y 2.2 pueden ser reinterpretadas y reescritas de la siguiente manera:



Por simplicidad, se notará como $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, entendiendo que la estructura electrónica del complejo es representada de manera más completa como $[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-) \leftrightarrow \text{MbFe}^{\text{II}}(\text{SH}^\bullet)]$.

En el caso de citocromo c férrico, fueron consideradas dos hipótesis sobre la forma de la curva cinética.¹⁹³ Por un lado, fue propuesto un paso lento de reemplazo de ligandos entre histidina y sulfuro, y por otro fue sugerida la aceleración de la reacción como consecuencia de productos de oxidación del sulfuro acumulados.

Como estrategia experimental para la propuesta de un mecanismo de autocatálisis, en nuestro caso, estudiamos la dependencia de las trazas cinéticas con la concentración de sulfuro inicial y con el pH.

2.1.2 Dependencia de la velocidad de reducción de MbFe^{III} respecto de $[\text{H}_2\text{S}]$

Los experimentos anóxicos fueron realizados a partir de MbFe^{III} 10 μM , agregando concentraciones iniciales de Na_2S desde 50 hasta 6000 μM ($R_{\text{S/Fe}} = 5$ a 600).

En primer lugar, consideraremos los experimentos con $R_{\text{S/Fe}} \leq 200$ y $\text{pH} = 7.4$. En la figura 2.8, panel A, se puede observar que para $R_{\text{S/Fe}}$ de 5 a 100, la fase inicial de crecimiento exponencial requiere menor tiempo y que la pendiente máxima de crecimiento, que se encuentra a $t = t_{50}$, se incrementa cuanto mayor es $[\text{Na}_2\text{S}]_0$. En particular, las trazas para las concentraciones más altas no muestran diferencias significativas aun cuando la concentración inicial se duplica (ej.: $R_{\text{S/Fe}} = 200$ vs 100).

Al analizar la fase lenta inicial de aparición de producto MbFe^{II} , en todos los casos se observa un perfil monoexponencial creciente, que permite derivar una constante experimental para el crecimiento exponencial. Llamaremos k'_{exp} a esta constante experimental que mostró

una dependencia lineal de la concentración inicial de Na_2S (figura 2.8, panel B). De la pendiente derivamos $k_{\text{exp}} = 9.1 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que será válida solamente en el rango lineal de la relación entre $[\text{Na}_2\text{S}]$ y k'_{exp} ($R_{\text{S/Fe}} \leq 100$). La constante k_{exp} es un parámetro del proceso global.

Adicionalmente observamos una dependencia sigmoidea de la conversión del sistema con $[\text{Na}_2\text{S}]$. Este tipo de comportamiento con respecto a la concentración de una especie se observa en curvas de afinidad entre una enzima y su sustrato, o en curvas farmacodinámicas, en las que se evalúa el efecto en función de las dosis. Una forma de denominarlas es bajo el término curvas de dosis-respuesta, que aluden a la respuesta del sistema en función de la concentración del sustrato efector.

En el caso de la interacción entre sulfuro y mioglobina, tomando valores de ΔA_{434} a tiempos seleccionados para distintas $R_{\text{S/Fe}}$, se observa un comportamiento sigmoideo en función de $[\text{Na}_2\text{S}]_0$ (figura 2.8, panel C). Allí se observan los valores de ΔA_{434} a 625, 1020 y 1511 segundos, que representan aproximadamente el inicio del crecimiento exponencial, el punto medio de la curva sigmoidea temporal, y el final del proceso de reducción, respectivamente. Los tres conjuntos de datos seleccionados se ajustan bien a funciones 4PL, lo que sugiere que se mantiene un comportamiento dosis-respuesta para todos los valores de $R_{\text{S/Fe}}$, independientemente de la presencia de reacciones secundarias cerca del final. Este análisis revela una doble dependencia llamada *respuesta dosis-tiempo* (*time-dose response*), también observada en los procesos químicos autocatalíticos.²³⁹

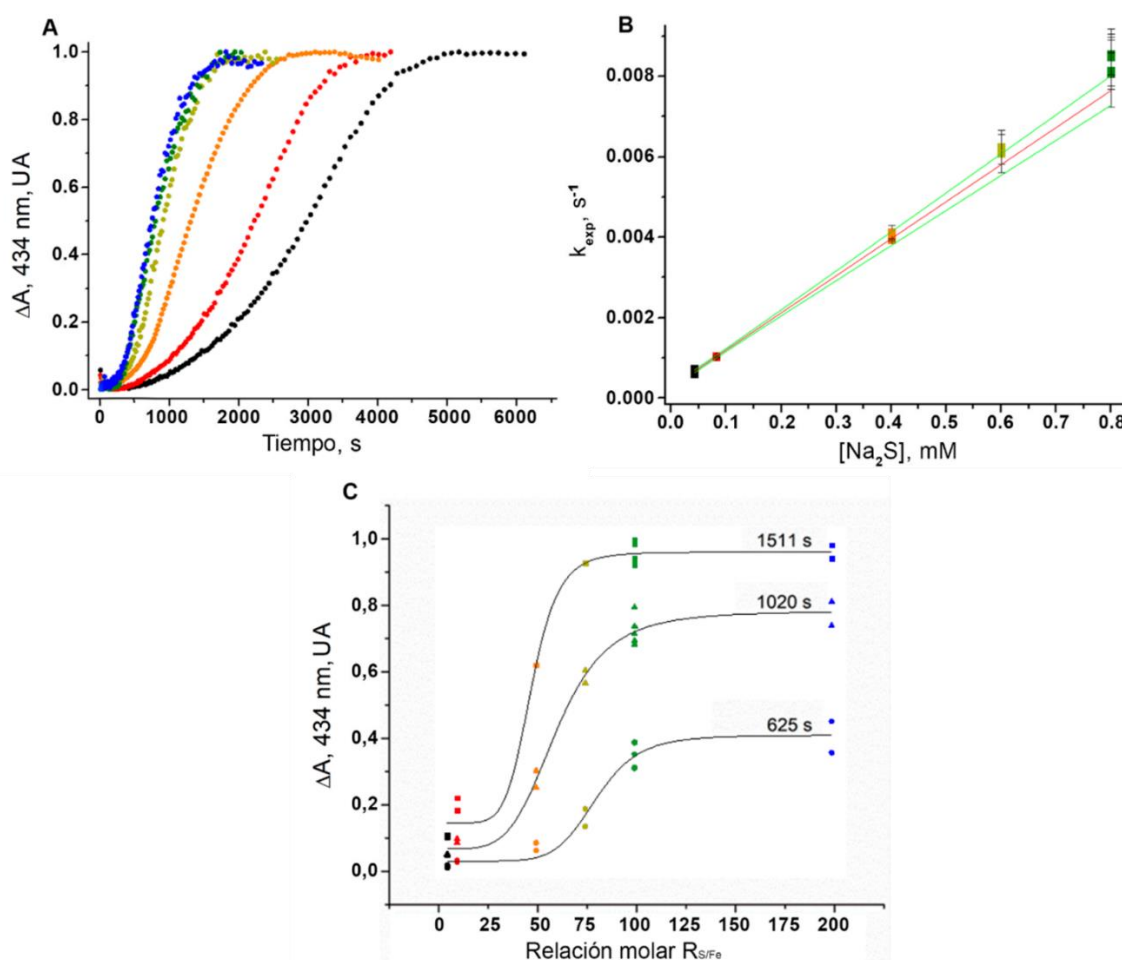


Figura 2.8. A) Cambios de absorbancia normalizada a 434 nm de MbFe^{III} por agregado de Na₂S en solución, con $R_{S/Fe} = 5, 10, 50, 75, 100, 200$ (negro, rojo, naranja, amarillo, verde y azul respectivamente) a pH = 7.4, 25°C; B) Regresión lineal de la k'_{exp} derivada del ajuste de crecimiento exponencial sobre la fase lenta de la reacción a pH 7.4 para $R_{S/Fe} = 5, 10, 50, 75$ y 100; C) Ajuste sigmoideo 4PL de datos experimentales (absorbancia normalizada a 434 nm) para la reacción de MbFe^{III} con Na₂S con $R_{S/Fe}$ de 5 a 200, pH = 7.4, 25°C, a valores de tiempo seleccionados. El código de colores para cada $R_{S/Fe}$ se mantiene para los tres paneles.

Resta analizar qué ocurre con concentraciones mayores de sulfuro. Como adelantamos, el comportamiento de la velocidad de la reducción de la MbFe^{III} respecto de la concentración inicial de sulfuro presenta dos regímenes. Para $R_{S/Fe} \approx 100$, a pH = 7.4, el tiempo de la fase de crecimiento alcanza un mínimo, y la pendiente a media altura alcanza prácticamente un máximo. Las diferencias observadas respecto de $R_{S/Fe}$ de 100 a 200 son ínfimas, lo cual está

asociado a una saturación del proceso cuando se alcanzan esas concentraciones en exceso de sulfuro. La tendencia es distinta cuando las concentraciones de sulfuro son superiores al punto en que la velocidad del proceso se satura. Lo que se observa pasado este punto es que, a mayor concentración de sulfuro inicial, menor es la velocidad del proceso global.

Al registrar k'_{exp} del crecimiento monoexponencial de la especie reducida MbFe^{II} en función de la concentración de sulfuro, se observa que ésta disminuye (figura 2.9). Esto se atribuye a la competencia entre el sulfuro presente en el medio y las especies reactivas formadas por oxidación (presumiblemente HSS^-), que requieren coordinarse al átomo de Fe^{III} de las moléculas de MbFe^{III} o $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.

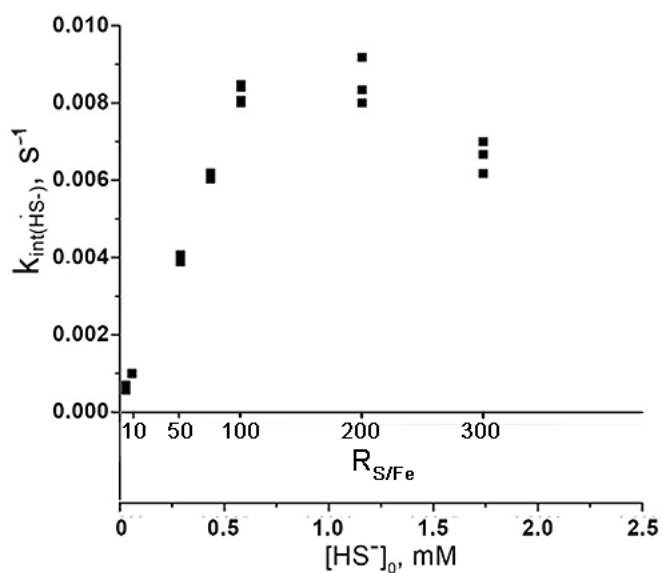


Figura 2.9. Constante derivada del crecimiento monoexponencial inicial $k_{\text{int}(\text{HS}^-)}$ para la fase lenta inicial de la reacción de MbFe^{III} y Na_2S a $\text{pH} = 7.4$, 25°C , a distintas relaciones molares $R_{\text{S/Fe}}$. En un segundo eje se muestra el equivalente a las concentraciones iniciales de HS^- .

En este análisis se observa un comportamiento dual que resultó inesperado. Por un lado, observamos un aumento de la velocidad global del proceso, y en particular de la fase lenta inicial de crecimiento exponencial del producto MbFe^{II} , proporcional al aumento de la concentración inicial de sulfuro. Observamos un rango de linealidad para esta relación hasta $R_{\text{S/Fe}} = 100$ en las condiciones experimentales de este apartado. Por otro lado, se observa que a concentraciones mayores de sulfuro el efecto del agregado de este es opuesto, con

una disminución de la velocidad de la reducción. Este resultado sugiere que el mecanismo de reducción no podría ser de esfera externa, y que la especie que cataliza la reacción requiere coordinarse al hierro hémico para reaccionar.

Teniendo en cuenta que las especies H_2S y HS^- coexisten a $\text{pH} = 7.4$ y su proporción relativa cambia significativamente alrededor de dicho valor de pH , se realizaron experimentos análogos variando el pH , presentados en la siguiente sección.

2.1.3 Dependencia de la reducción de MbFe^{III} con sulfuro con el pH . Rol de la especiación del sulfuro

El proceso fue estudiado a pH variable, en el intervalo de 5.3 a 8.0. En este intervalo de pH se asegura que la especie predominante es $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$, sin cambios en el sitio activo.¹⁴¹ Los resultados cinéticos están presentados en la Figura 2.10.

La velocidad de la reducción de la MbFe^{III} mediada por sulfuro muestra mayores velocidades conforme el pH aumenta. Esto se contrapone a lo que ocurre con la velocidad de coordinación en función de pH , para la cual la especie preferida por su ausencia de carga, su esfera de solvatación más lábil y la consecuente facilidad de migración por un canal hidrofóbico es H_2S .¹⁴³

En este caso, se puede observar el acortamiento de la etapa inicial de crecimiento exponencial del proceso, al agregar 100 equivalentes (1 mM) de sulfuro en condiciones anóxicas, $R_{\text{S/Fe}}=100$, $5.3 < \text{pH} < 8.0$, $T=25^\circ\text{C}$. Se observan trazas de forma sigmoidea asimétrica a todos los pH estudiados. La alta concentración de sulfuro seleccionada responde a que se pretende iniciar la reacción con el máximo posible de complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ en el equilibrio. A mayores concentraciones, en los experimentos a $\text{pH} 7.4$, había sido observado que la velocidad global del proceso no aumenta, y que puede incluso disminuir con un exceso por encima de 1 mM de HS^- frente a $\text{MbFe}^{\text{III}} 10 \mu\text{M}$.

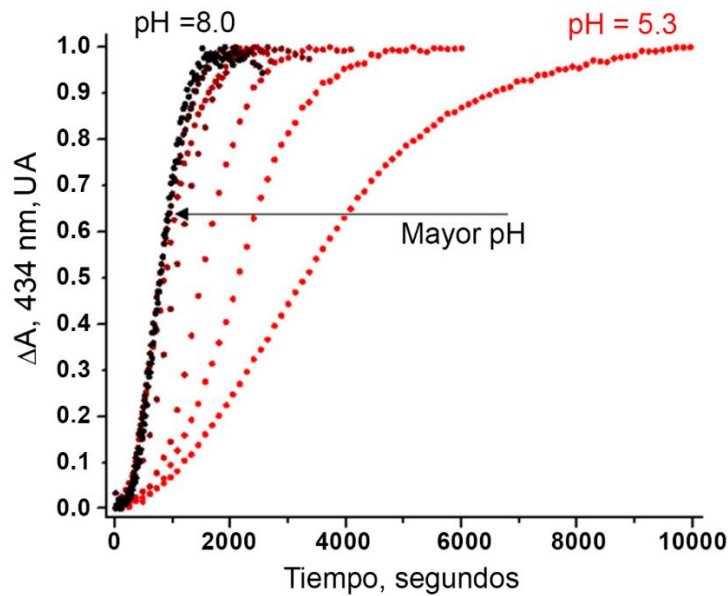


Figura 2.10. Evolución temporal de la absorbancia normalizada a 434 nm de $MbFe^{III}$ luego del agregado de Na_2S a una relación molar de $R_{S/Fe} = 100$, variando el pH desde 5.3 hasta 8.0 (puntos rojos a negros, respectivamente).

Las trazas cinéticas se analizaron por medio de funciones 5PL para obtener el t_{50} de la función sigmoidea. La inversa de t_{50} , a la que llamamos $k_{int(HS^-),5PL}$ fue graficada en función de la concentración de anión $[HS^-]$, calculada en base a la concentración analítica de Na_2S y al pH del sistema. Hicimos esta distinción ya que HS^- es la especie implicada en la formación de $HSSH^{*-}$, y eventualmente HSS^- , como candidatos a intermediarios catalíticos.

El análisis se extendió a relaciones molares entre $25 < R_{S/Fe} < 600$, para cubrir el mayor número de variables. Los experimentos a $pH < 7.0$ con concentraciones muy elevadas de sulfuro imponen un límite al análisis porque se forma azufre coloidal de forma significativa, favorable por concatenación de los polisulfuros que se forman *in situ*,¹⁰¹ causando dispersión de luz y dificultando el registro experimental.

Los resultados se observan en la figura 2.11, en la cual se pueden apreciar dos regímenes para todos los pH estudiados, al igual que en los experimentos a $pH=7.4$. Esto es, a bajas concentraciones se observa un aumento lineal de la velocidad del proceso global hasta un determinado punto de saturación, luego del cual el agregado por exceso de HS^- provoca una disminución de la velocidad global.

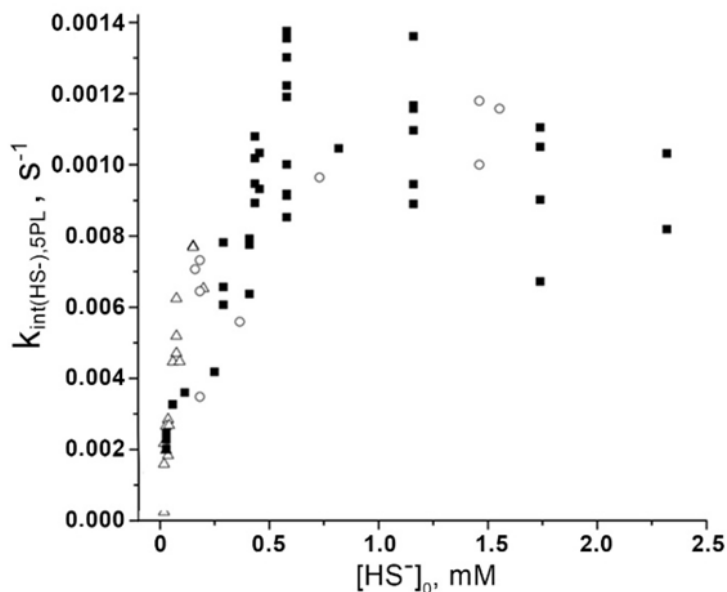


Figura 2.11. Constante intrínseca global ($k_{\text{int},\text{HS}^-/5\text{PL}}$) derivada del ajuste sigmoideo 5PL de la absorbancia normalizada a 434 nm para la reducción de MbFe^{III} en función de la concentración inicial de HS^- , a $6.0 \leq \text{pH} \leq 7.0$ (triángulos), a $7.0 \leq \text{pH} \leq 7.4$ (cuadrados negros), y a $7.4 \leq \text{pH} \leq 8.0$ (círculos).

La relación entre la cantidad de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)/\text{MbFe}^{\text{III}}_{\text{total}}$ provee pistas para entender a qué obedece la saturación de la velocidad del proceso. En la figura 2.12, se observa la correlación entre la proporción de complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ inmediatamente después del agregado de sulfuro, que alcanza el equilibrio en pocos segundos, y la constante $k_{\text{int},\text{HS}^-/5\text{PL}}$ estimada. Se observa claramente que el máximo de velocidad alcanzado por el sistema coincide con la concentración de sulfuro inicial a la cual la conversión al complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ es prácticamente completa ($[\text{HS}^-] \approx 1 \text{ mM}$). También se observa que el agregado de mayores concentraciones de sulfuro no altera el equilibrio del complejo, pero la velocidad del proceso de reducción disminuye.

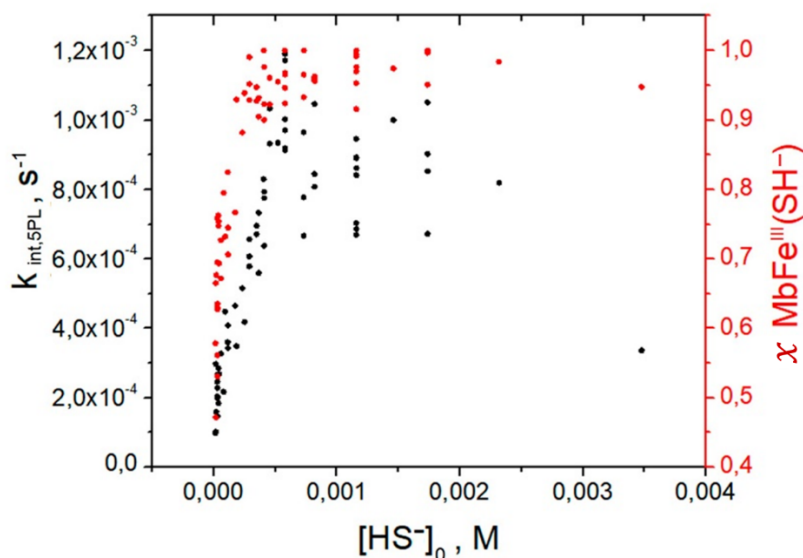
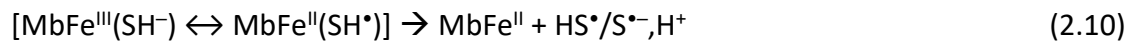


Figura 2.12. Constante cinética global de la reducción de MbFe^{III} mediada por H_2S ($k_{\text{int,SPL}}$) a $6 < \text{pH} < 8$, 25°C (puntos negros) y fracción de complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ formado en equilibrio luego del agregado de sulfuro a MbFe^{III} (puntos rojos).

Los resultados muestran que la inducción y pendiente del perfil sigmoideo son sensibles al pH, y que hay una dependencia con la proporción de complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ inicial, que impone un límite.

Estos resultados en conjunto sugieren que el anión HS^- es una especie crucial en el mecanismo de autocatálisis. Retomando algunas reacciones presentadas en secciones anteriores, proponemos que el mecanismo incluye la ruptura homolítica del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, dejando como productos la MbFe^{II} y el radical $\text{HS}^\bullet/\text{S}^{\bullet-}$ (reacción 2.10). En un medio rico en la especie HS^- a pH alcalino, está favorecida la formación de especies radicalarias $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ (reacción 1.23). Además, esta especie $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ es capaz de dismutar para dar HSS^- (reacción 1.32).



El anión HSS^- es más nucleofílico y mejor reductor que HS^- , por lo que es una posible especie reductora de MbFe^{III} , o incluso de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$. El radical anión $\text{HSSH}^{\bullet-}$ también ha sido reportado como un potente reductor. Proponemos que estas especies de dos átomos de azufre, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y HSS^- serían responsables del aumento de la velocidad, es decir, de que el proceso de reducción sea autocatalítico.

La disminución de la velocidad de reducción de MbFe^{III} a altas concentraciones de sulfuro total sugiere que las especies que mediarían la autocatálisis deben competir con el exceso de sulfuro del medio para coordinarse al grupo hemo, lo cual podría restringir su acción en esas condiciones. Estas especies son entonces posibles ligandos para MbFe^{III} , contrariamente a la propuesta de mecanismo por esfera externa.¹⁷⁴ Por lo anterior, las evidencias experimentales sugieren que el mecanismo de reducción autocatalítica de MbFe^{III} es de esfera interna.

2.2 Intermediarios de reacción

Como parte del mecanismo de reducción de MbFe^{III} por sulfuro en condiciones anóxicas, un paso clave es la oxidación de HS^- coordinado por un electrón, con la reducción concomitante de un equivalente de la proteína.



Dada la relevancia de $\text{HS}^{\bullet}/\text{S}^{\bullet-}$, $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y HSS^- en el mecanismo de reacción, diversos aspectos de estas especies resultaron de interés para interpretar su participación: especiación, pK_a y estabilidad, reconocimiento, y localización en el medio de reacción.

Ya que la autocatálisis de la reducción de MbFe^{III} mediada por H_2S presenta una dependencia manifiesta con el pH, es necesario conocer la especiación de los intermediarios propuestos para validar y describir su posible participación. El estado de protonación de una molécula puede definir desde su estabilidad química hasta su reactividad, y la posibilidad de migrar hacia el sitio activo de una proteína, entre otros aspectos.

La naturaleza radicalaria de especies participantes de un mecanismo de reacción es típicamente reconocida y explorada usando atrapantes de radicales que, según su naturaleza química, podrán resultar más o menos eficientes.

Por último, es de interés investigar la posible residencia de las especies propuestas dentro de la matriz proteica o bien en el medio externo, de modo de evaluar su reactividad subsiguiente en el desarrollo del mecanismo de reacción.

En las próximas secciones presentaremos resultados de distintas estrategias empleadas para evaluar estos aspectos de las especies reactivas del azufre que proponemos como participantes de la reacción entre MbFe^{III} y sulfuro.

2.2.1 Evaluación computacional de las constantes de acidez de HSSH y HS•

Tanto para el HSSH como para HS•, hay cierta dispersión en los valores asignados a sus constantes de acidez, como se adelantó en las tablas 1.3 y 1.4 del Capítulo introductorio. Existen distintos métodos para evaluar de manera teórica el pK_a de una especie química. Con la colaboración del Grupo de Modelado Molecular de INQUIMAE, realizamos una evaluación teórica en base a optimización geométrica y cálculos de ΔG por DFT, para calcular valores de constantes de acidez y discutir los valores reportados. Los cálculos para la especie HSSH^{•-} presentaron dificultades para la optimización, como mostraremos más adelante.

El enfoque más sencillo sería calcular las energías libres de todas las especies que aparecen en la ecuación de desprotonación en agua (reacción 2.11). Por ejemplo, para el caso de HSSH/HSS⁻ sería:



Sin embargo, la estimación computacional de los valores de pK_a suele requerir consideraciones adicionales y enfoques indirectos. Por ejemplo, los cálculos de las energías de solvatación de especies cargadas pequeñas, particularmente de H₃O⁺ y HO⁻, son propensos a errores.^{240–242} Se obtienen variaciones de hasta decenas de kcal/mol

dependiendo del método empleado, y especialmente cuando se utiliza solvente implícito como medio dieléctrico continuo.

Una forma relativamente sencilla consiste en reemplazar el agua por otra cupla ácido-base de pK_a conocido. Por ejemplo, han sido reportados cálculos usando como referencia la anilina en DMSO para el cálculo de tioles en su mayoría aromáticos,²⁴³ y acetamida para ácidos orgánicos en medio acuoso.²⁴⁴ En ambos casos, la premisa fue que la especie de referencia debe ser estructuralmente similar a las especies evaluadas. A este método se le conoce como método de intercambio de protón. En nuestro caso la cupla de referencia seleccionada es H_2S/HS^- . Con este cambio de enfoque, hemos estudiado el pK_a de HSSH y $HS^\bullet$ utilizando las reacciones 2.12 y 2.13.



Las constantes de acidez $pK_{a1}(HSSH)$ y $pK_a(HS^\bullet)$ pueden ser calculadas a partir del pK_a conocido, $pK_{a1}(H_2S/HS^-)$ y la diferencia de energía libre o de intercambio de protón (*proton exchange*, ΔG_{exc}) derivada de las ecuaciones anteriores, mediante la ecuación 2.6.

$$pK_a(HX) = pK_{a1}(H_2S) - \frac{\Delta G_{exc}}{2.303 RT} \quad (\text{ec. 2.6})$$

Las optimizaciones de geometría y cálculo de energía en el mínimo local encontrado se realizaron con distintos métodos, empleando siempre un conjunto de bases extendido, 6-31++G(2df,2p), ya que el modelado de compuestos con S mejora significativamente con el uso de bases extendidas.^{245–247}

La tabla 2.1 muestra los valores de pK_{a1} de HSSH y de pK_a de $HS^\bullet$ obtenidos a partir de la ecuación 2.1 con los resultados de la optimización estructural con distintos métodos y el conjunto de bases 6-31++G(2df,2p), y los valores que se encontraron en literatura. Los valores de pK_{a2} de HSSH no fueron estimados por un lado porque la optimización de especies relativamente pequeñas con alta densidad de carga como SS^{2-} conllevan un error significativo en este tipo de cálculos; por otro lado, dado que se necesita una especie similar a la estudiada como referencia, en este caso sería $HSSH/HSS^-$, cuyo pK_{a1} también es

estimado por este método. En estas condiciones, la precisión del cálculo de pK_{a2} sería dependiente de la fiabilidad del valor calculado de pK_{a1} .

Método	pK_{a1} (HSSH/HSS ⁻)	pK_a (HS [•] /S ^{•-})
B3LYP	5.5	6.6
MP2	4.5	7.1
M06-2X	5.2	6.6
ω B97xD	5.3	6.2
CC(SD)	5.2	7.1
Valores reportados	2.6, ⁴⁷ 5.0, ⁹¹ 5.11, ³⁴ 7.1. ⁹⁶	<7, ¹²⁹ <<7, ¹³⁶ <3, ⁵⁰ $\approx$ 4, ¹³⁹ 3.4. ⁴⁸

Tabla 2.1. Valores de pK_a para pares ácido-base seleccionados calculados por medio del método de intercambio de protón, usando H_2S como especie de referencia. La última fila presenta los valores reportados en la literatura, experimentales y teóricos, a fines comparativos.

Para el HSSH se observa buen acuerdo entre los valores calculados y los valores experimentales, en ambos casos cercanos a 5. Sólo el método MP2 presenta una desviación del conjunto de datos calculados. El método *coupled cluster*,²⁴⁸ notado como CC(SD) en el caso de contemplar excitaciones simples y dobles, se destaca por su precisión a la hora de describir los efectos de la correlación electrónica, que no se incluyen en las aproximaciones de campo medio. Por lo tanto, consideramos que los resultados de CC(SD) son de mejor calidad. Con este estudio, corroboramos un valor de $pK_{a1}(HSSH) \approx 5.1$, y por tanto HSS⁻ como especie mayoritaria en el intervalo $6.0 \leq pH \leq 8.0$.

En el caso de HS[•] la situación es distinta. Los valores calculados se encuentran cercanos a 7, con excepción del valor calculado por el método ω B97xD que se aleja un poco más (6.2). La discrepancia con los datos de literatura es significativa, y tiene un impacto importante en la descripción de la presencia de esta especie radicalaria en el mecanismo. De los cinco

trabajos encontramos que reportan constantes de acidez de $\text{HS}^\bullet$, tres de ellos lo establecen como una cota superior. En uno de los trabajos mencionados establecen que probablemente $\text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) < 7$ basándose en las diferencias que observan en función del pH para la fotólisis de H_2S .¹²⁹ En otro trabajo estudian la oxidación de H_2S por $\text{O}^{\bullet-}$ y $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ a distintos pH, y reportan que observan la presencia de $\text{HS}^\bullet$ sólo a $\text{pH} < 2$. Establecen que $\text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) < 7$.¹³⁶ El último que establece el valor de la constante de acidez como una cota, hace una comparación directa de la diferencia de pK_a entre $\text{HO}^\bullet$ y H_2O , y entre los análogos azufrados, para estimar que $3 < \text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) < 4$.⁵⁰ Luego, un trabajo experimental de oxidación de lípidos por $\text{HS}^\bullet$, obtenido por fotólisis, sugiere un $\text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) \approx 4$ debido a que observan que la velocidad del proceso reactivo estudiado es similar a pH 5 y 7.¹³⁹ Por último, fue recomendado un valor de $\text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) = 3.4$ por IUPAC,⁴⁸ en base a distintos parámetros termodinámicos y aproximaciones. Los autores advierten en el material suplementario que pese a recomendar dicho valor, algunas de las aproximaciones involucradas en el cálculo requerirían revisión. Teniendo en cuenta que nuestro método de cálculo fue satisfactorio para modelar la acidez de HSSH en consonancia con el valor experimental,^{34,92,249} adoptamos $\text{pK}_a(\text{HS}^\bullet) \approx 7$, lo cual sugiere que coexisten las especies $\text{HS}^\bullet/\text{S}^{\bullet-}$ en el intervalo de pH de trabajo, empleado en esta Tesis.

2.2.2 Estabilidad de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ / $\text{HSS}^{\bullet 2-}$

Los cálculos de optimización de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ resultaron también de nuestro interés, debido a que es una especie relacionada a $\text{HS}^\bullet$, y aparece en equilibrio con esta, especialmente en soluciones ricas en sulfuro.

Realizamos un estudio sobre la estabilidad de estos radicales en su forma libre, descriptos en la literatura.^{50,129,250} $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ fueron evaluados en un conjunto amplio de combinaciones de bases y métodos para su optimización de geometría (tabla 2.2). Se utilizaron geometrías de partida con distancias de enlace $\text{dS-S} = 2 \text{ \AA}$ y $\text{dS-H} = 1.2 \text{ \AA}$, ángulos $\text{S}\hat{\text{S}}\text{H} = 120^\circ$, y ángulo diedro de 90° para el caso de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ (figura 2.13).

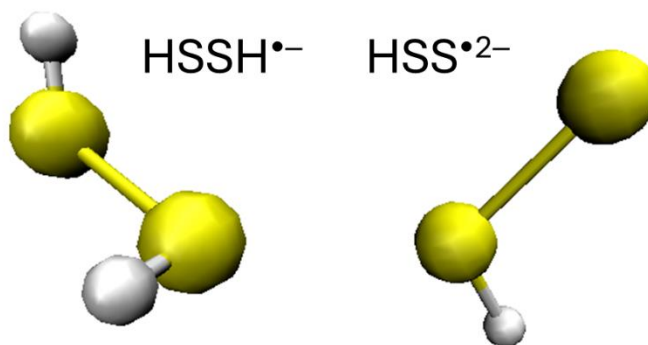


Figura 2.13. Estructuras iniciales para la optimización de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$.

Funcional	Base	$\text{HSSH}^{\bullet-}$		$\text{HSS}^{\bullet 2-}$
		Convergencia	Distancia S-S	Convergencia
B3LYP	6-31G*	No	-	No
ω B97XD	6-31G*	No	-	No
PBE	6-31G**	Sí	2.91	No
PBE0	6-31G**	No	-	No
B3LYP	6-31+G(2df,p)	Sí	2.88	No
PBE	6-31+G(2df,p)	No	-	No
CC(SD)	6-31+G(2df,p)	Sí	2.92	No
B3LYP	6-311++G(2df,2p)	No	-	No
ω B97XD	6-311++G(2df,2p)	No	-	No
M06-2X	6-311++G(2df,2p)	No	-	No
MP2	6-311++G(2df,2p)	No	-	No
CC(SD)	6-311++G(2df,2p)	Sí	2.73	No

Tabla 2.2. Convergencia y distancia de enlace S-S para $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ con diversos métodos y conjuntos de bases.

En el caso de la especie $\text{HSS}^{\bullet 2-}$, se observó la ruptura del enlace S-S en todos los niveles de teoría empleados. Como producto de la ruptura se observan estructuras consistentes con la descomposición en HS^- y $\text{S}^{\bullet-}$ según la reacción de ruptura reportada (reacción 1.23).⁵⁰

En el caso de $\text{HSSH}^{\bullet-}$, la estabilidad de la estructura resultó ser fuertemente dependiente de la base y método utilizado. Con algunas bases y métodos, los pasos de optimización oscilan en torno a estructuras en las cuales la distancia entre los átomos de azufre, $d_{\text{S-S}}$, es particularmente larga para un enlace covalente (tabla 2.2).

Como parte de una colaboración,¹ fue realizada una evaluación de estas especies en solvente explícito, por medio de cálculos híbridos de dinámica molecular (MD, *molecular dynamics*) con mecánica clásica y mecánica cuántica (QM/MM).²⁴⁹ Las especies $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ fueron modeladas cuánticamente con nivel de teoría PBE/DZVP. Las 400 moléculas de agua circundantes fueron modeladas por medio del campo de fuerza clásico TIP3P. La simulación de dinámica molecular sin restricciones fue realizada por un intervalo de 5ps. Las distancias de enlace S-S medias obtenidas de las dinámicas moleculares fueron de 2.9 Å y 3.1 Å para $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$, respectivamente (figura 2.14). Esto es consistente con la tendencia observada para especies no radicalarias, en las que la desprotonación implica el aumento de la longitud de los enlaces S-S.⁹²

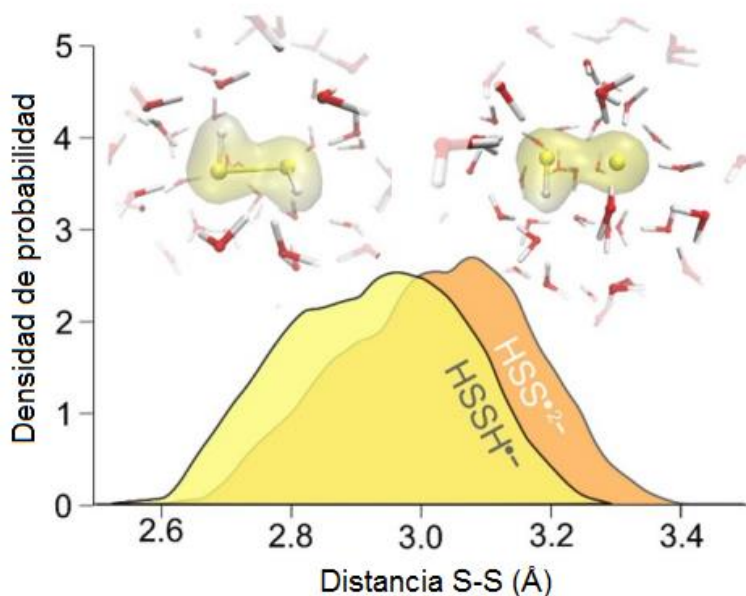


Figura 2.14. Densidades de probabilidad de la distancia S-S en $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$. Los resultados se obtuvieron a partir de una dinámica molecular QM/MM de 5 ps de duración (nivel de teoría para la

¹ Los cálculos de dinámica molecular QM/MM fueron realizados por el Dr. Jonathan Semelak y el Dr. Darío Estrin del Grupo de Modelado Molecular, INQUIMAE-CONICET.

región QM: PBE/DZVP; campo de fuerza MM: TIP3P). También se muestra una instantánea típica de la simulación. Extraída de Palermo et al. (2022).²⁴⁹

Las estructuras promedio de QM/MM MD fueron optimizadas en solvente implícito a nivel de teoría PBE/DZVP. Para HSSH^{•-} la distancia de enlace calculada fue de 2.9 Å, mientras que HSS^{•2-} presentó una distancia de enlace de 3.1 Å. En ambos casos, los valores calculados fueron coincidentes con el valor medio en QM/MM MD. Esto sugiere que la estabilización de estas especies, en especial del radical aniónico HSS^{•2-}, requiere la primera esfera de solvatación completa, manteniendo los átomos de S rodeados por una red de puentes de hidrógeno que actúa como jaula (*solvent-cage*).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que 1) la forma protonada HSSH^{•-} sería relativamente menos inestable que su base conjugada HSS^{•2-}, 2) es probable que ambas formas sean altamente reactivas debido a su lábil distancia S-S, y 3) una descripción fiable de sus propiedades químicas en solución acuosa requiere un modelado explícito del entorno acuoso.

En la literatura existen otras evidencias teóricas que permiten considerar HSSH^{•-}/HSS^{•2-} como una cupla inestable. HSSH^{•-} ha sido evaluado en el contexto de la familia de especies isoelectrónicas con enlaces de dos centros y tres electrones (2c-3e).^{250,251} En una evaluación comparativa fueron reportadas distancias de enlace más largas para HSSH^{•-} (2.7-2.8 Å) que para el disulfano neutro HSSH (2.1 Å).²⁵⁰ Además, fueron evaluados comparativamente los perfiles de energía de disociación para ambos (figura 2.15), y se observó no sólo la misma diferencia en la distancia de enlace en la que se ubica el mínimo de energía, sino que el pozo de energía potencial para HSSH^{•-} es significativamente menor (en promedio 24 kcal/mol vs 55 kcal/mol para HSSH).

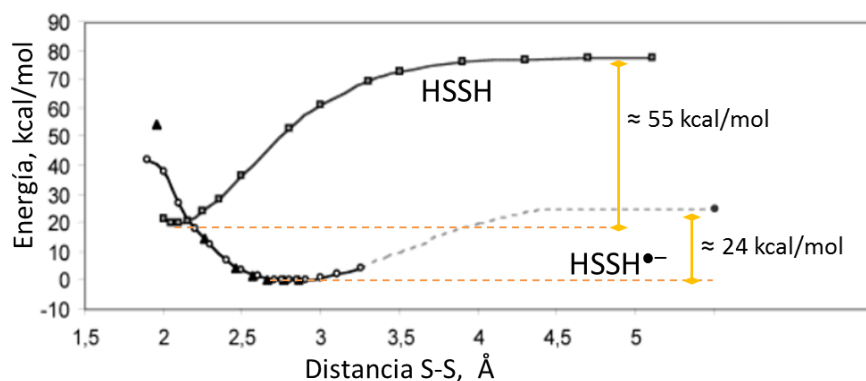


Figura 2.15. Perfiles de energía de disociación calculados para la molécula de HSSH y HSSH*-. La afinidad electrónica experimental que se utilizó para construir el diagrama es de 53.4 kcal/mol para HSSH*-. Adaptado de Braida et al. (2002).²⁵⁰

La inestabilidad de HSSH*- puede ser evaluada en función de su estructura electrónica.

En una aproximación elemental de la teoría de orbitales moleculares (OM), la formación de un enlace de tres electrones entre dos fragmentos equivalentes puede modelarse mediante la interacción perturbativa del orbital molecular de mayor ocupación (HOMO) de cada fragmento.²⁵² La interacción conduce a un OM σ enlazante doblemente ocupado, y a un OM σ^* antienlazante con un electrón desapareado. El orden de enlace de este tipo de sistemas es de 0.5, lo cual implica que la promoción de un electrón conllevaría la ruptura del enlace S-S. El primer estado excitado de HSSH*- es un estado repulsivo que se disocia en los componentes originales según la reacción opuesta a la reacción 1.23.¹²⁹



Combinando los resultados obtenidos como parte de esta Tesis y la información sobre especies 2c-3e de la literatura, podemos concluir que HSSH*- sería una especie marginalmente estable, por su alta reactividad y la alta velocidad de sus reacciones de descomposición.^{50,129} Desde un punto de vista teórico, corroboramos la baja estabilidad de HSSH*- y más aún de su base conjugada HSS*²⁻ teniendo en cuenta: 1) las distancias de enlace S-S notablemente mayores respecto de las especies no radicalarias análogas (2.9 Å para HSSH*-;²⁴⁹ y 2.1 Å para HSSH²⁴⁹); 2) la baja energía relativa de disociación de 24 kcal/mol para HSSH*- en comparación con la energía relativa de disociación de HSSH; 3) los

potenciales de reducción estimados $E^\circ(\text{HSS}^-/\text{HSS}^{\bullet 2-}) = -1.13 \text{ V}$ y $E^\circ(\text{HSS}^{\bullet 2-}/\text{HS}^-) = +0.64 \text{ V}$ que en conjunto la ubican como una especie inestable en el diagrama de Frost (figura 1.6);⁴⁷ 4) la labilidad del enlace S-S cuando se lo modela en ausencia de solvente explícito;²⁴⁹ y 5) la necesidad de interacciones con la jaula de solvente para la estabilización de estas especies (Dres. Semelak y Estrin).²⁴⁹

Estas evidencias sobre la baja estabilidad de las especies $\text{HSSH}^{\bullet -}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ sugieren que estas especies difícilmente sean buenas candidatas para acelerar la reducción de MbFe^{III} , ya que esta requiere de la coordinación de la especie en cuestión. Por un lado, la barrera calculada para la migración de las especies aniónicas HS^- ,¹⁴³ y HSS^- ,²⁵³ desde el medio al sitio activo es de aproximadamente 7 kcal/mol, atribuida en ambos casos a la carga negativa que les confiere una esfera de solvatación cuya disociación es energéticamente más costosa. En esta línea es razonable especular que $\text{HSSH}^{\bullet -}$ debe presentar una barrera teórica similar para la migración, y que su base conjugada $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ presente una barrera aún mayor.

Por otro lado, en los antecedentes presentados para la reacción en estudio había sido reportada una relación inversamente proporcional entre la velocidad de la reducción de MbFe^{III} por sulfuro y la concentración de sulfuro en condiciones subestequiométricas.¹⁷⁴ Esta evidencia fue empleada para argumentar en contra de la participación de una molécula de H_2S o $\text{HS}^\bullet$ del medio actuando sobre el complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, y por lo tanto tampoco permite especular con la formación de una especie como $\text{HSSH}^{\bullet -}$ directamente sobre la plataforma hémica. Más aún, nuestros experimentos en exceso de sulfuro ($R_{\text{S/Fe}} > 200$), que muestran que la velocidad global de reducción es menor cuanto mayor es la concentración inicial de sulfuro, también permiten argumentar contra aquella hipótesis.

2.2.3 Captura de radicales intermediarios en la reducción de MbFe^{III} por H_2S

Para evaluar la participación de especies químicas radicalarias, estudiamos el comportamiento de la reducción de MbFe^{III} en presencia de agentes capaces de reaccionar con ellas. Si la reacción se detuviera, o bien su velocidad disminuyera en presencia de interferentes de radicales por atrapamiento, o por transformación química, sería indicativo de que las especies radicalarias juegan un papel clave en el mecanismo.

Los atrapantes de radicales son especies químicas que tienen la capacidad de reaccionar con radicales libres y formar aductos. Para el presente trabajo, se seleccionaron atrapantes de la familia de las nitronas cuyos aductos también son radicalarios (figura 2.16). Por su estructura, el aducto radical formado suele ser más estable que el radical libre, y esto permite hacer una identificación indirecta.

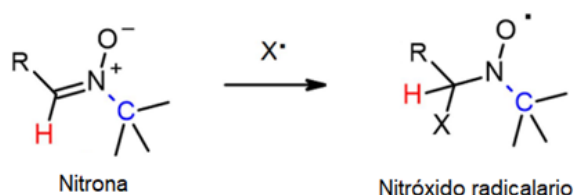


Figura 2.16. Estructura básica de un atrapante de radicales tipo nitrona. Reacción con un radical genérico $X^{\bullet}$ para dar un aducto tipo nitróxido.

Concretamente utilizamos dos nitronas atrapantes de radicales, el 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO, *dimethyl-pyrroline-N-oxide*) y la α -fenil-N-tert-butilnitrona (PBN, *α -phenyl-N-tert-butyl-nitrone*), que poseen un grupo nitróxido, capaz de aceptar y estabilizar una especie radicalaria (figura 2.17).

DMPO es una nitrona cíclica ampliamente utilizada, que ha sido reportada como atrapante de $\text{HO}^{\bullet}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$,²⁵⁴ $\text{CO}_2^{\bullet-}$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$,²⁵⁵ $\text{SO}_2^{\bullet-}$, $\text{SO}_3^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$,²⁵⁶ y radicales tiilo $\text{RS}^{\bullet}$.^{257,258} PBN es una nitrona lineal, que se caracteriza por su mayor lipofiliidad.²⁵⁹ El uso de este atrapante ha sido reportado para $\text{HO}^{\bullet}$,²⁶⁰ $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2^{\bullet}\text{OH}$, $^{\bullet}\text{CH}_2\text{OH}$,²⁶¹ $\text{Cl}^{\bullet}$,²⁶² y $\text{RS}^{\bullet}$.^{263,264} Usualmente son utilizadas para la detección de los radicales libres mediante espectroscopía de resonancia electrónica paramagnética (EPR, *electron paramagnetic resonance*) a través de la formación de aductos radicalarios tipo nitróxido.

Alternativamente a las nitronas, también utilizamos al metilviológeno, MV^{2+} (figura 2.17), conocido como paraquat, como interferente. Se trata de un oxidante catiónico que ha sido utilizado para el atrapamiento de $\text{HS}^{\bullet}$ (reacción 2.14) u oxidación de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ (reacción 2.15).¹²⁹ Dada la posibilidad de reaccionar con los radicales postulados como intermediarios en el mecanismo de reducción de MbFe^{III} , la reacción de un agente como el MV^{2+} también

fue propuesta como una posible interferencia que ofreciera pistas sobre aspectos mecanísticos.

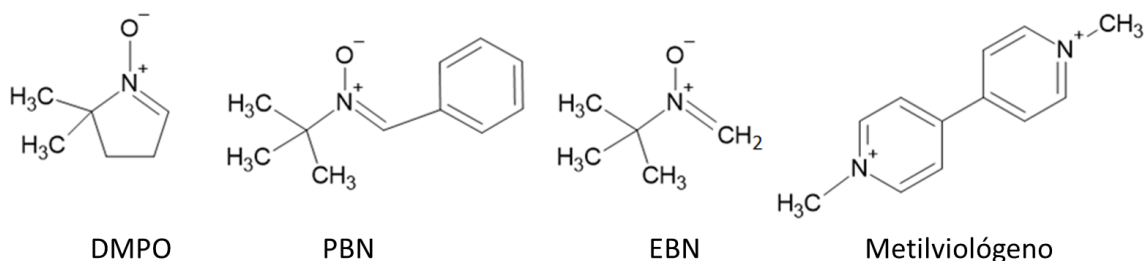


Figura 2.17. Estructura química de DMPO, PBN, EBN y MV^{2+} .

Llevamos a cabo experimentos cinéticos en anoxia, a pH = 7.4, 25°C, en presencia de DMPO, PBN o MV^{2+} para evaluar la participación de radicales en el mecanismo de la reacción de reducción de MbFe^{III} por sulfuro.

Los espectros UV-Vis obtenidos en todos los experimentos muestran en el intervalo de 300 a 800 nm de longitud de onda señales correspondientes a MbFe^{III} , $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ y MbFe^{II} , tanto en ausencia como presencia de los interferentes. Por lo tanto, se asume que el sitio activo y el grupo prostético no sufren modificaciones por la presencia de DMPO, PBN ni MV^{2+} , es decir que se observa la formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ con señales en 428, 545 y 578 nm, y su reducción a MbFe^{II} con señales en 434 y 556 nm. Además, también asegura que estas especies no absorben significativamente en la zona del espectro analizada. Las diferencias observadas corresponden sólo a la cinética del proceso ya descrito.

En las Figuras 2.18, 2.19 y 2.20 se presentan las trazas cinéticas de formación del producto reducido MbFe^{II} por registro en función del tiempo de la absorbancia normalizada a 434 nm, perteneciente al máximo de absorción de la banda de Soret de MbFe^{II} .

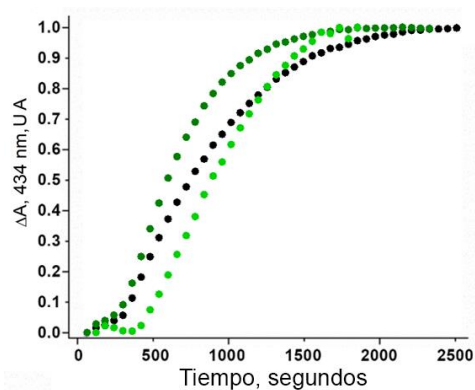


Figura 2.18. Trazas cinéticas de absorbancia a 434 nm para la reacción de MbFe^{III} 8 μM con $R_{\text{S/Fe}} = 100$ (800 μM) en ausencia (negro) y presencia de DMPO 0.8mM (verde oscuro) y 2.4mM (verde claro).

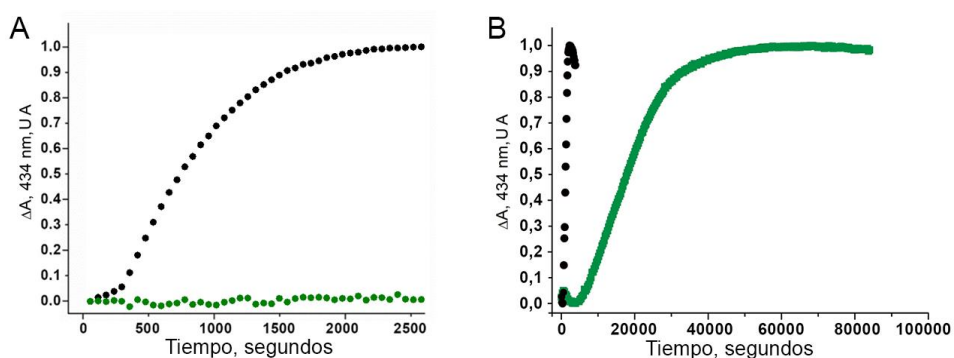


Figura 2.19. Trazas cinéticas de absorbancia a 434 nm para la reacción de MbFe^{III} 8 μM con $R_{\text{S/Fe}} = 100$ (800 μM) en ausencia (negro) y presencia de PBN 1600 μM (verde). Los paneles A y B muestran distintas escalas de tiempo, de 2500 segundos y 80000 segundos respectivamente.

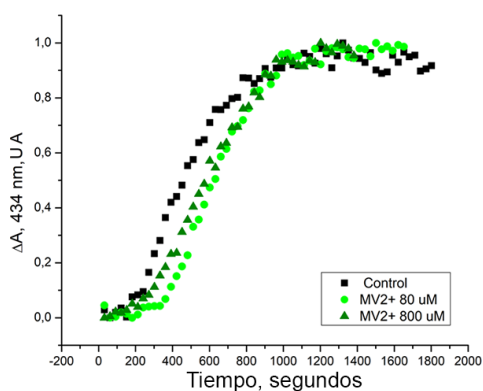


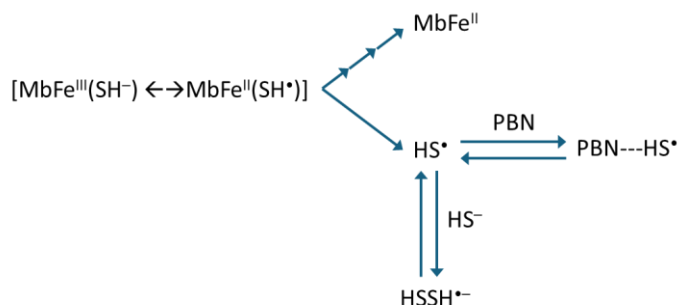
Figura 2.20. Trazas cinéticas de absorbancia a 434 nm para la reacción de MbFe^{III} 8 μM con $R_{\text{S/Fe}} = 100$ (800 μM) en ausencia (cuadrados negros) y presencia de MV^{2+} 80 μM (círculos verdes claros) y 800 μM (triángulos verdes oscuros).

Como se observa en las figuras 2.18 y 2.20, la cinética en presencia de DMPO y MV^{2+} no presenta diferencias significativas respecto del experimento control.

Contrariamente, en el caso de PBN se observa que la velocidad de la reacción global disminuye significativamente. En la figura 2.19, panel A, se observa que la reacción se completa en 2500 segundos en ausencia del atrapante, mientras que la reacción en presencia de PBN no muestra cantidades significativas de producto formado en la misma escala de tiempo. El avance de la reacción se hace visible luego de 5000 segundos, y se completa luego de aproximadamente 16 horas de reacción (panel B).

Postulamos que el paso controlante del proceso global es el de homólisis del complejo $MbFe^{III}(SH^-)$ (reacción 2.2), debido a que la traza obtenida mantiene la forma sigmoidea y ajusta igualmente a funciones 4PL y 5PL, con mejor ajuste en la última. Esto indicaría que la reacción no fue detenida, sino que su velocidad global fue disminuida. La presencia de PBN reduce la concentración efectiva de radicales $HS^\bullet$, teniendo en cuenta que el atrapamiento de radicales por nitronas tiene cierta reversibilidad.²⁶⁵ Puntualmente lo que esto sugiere es que PBN interfiere con los pasos de reacción responsables del aumento de la velocidad global de reducción de $MbFe^{III}$.

Desde el punto de vista mecanístico, el PBN estaría compitiendo con HS^- por $HS^\bullet$ como especie intermediaria, con lo cual sugerimos que se comporta como un inhibidor competitivo (esquema 2.1). Esto sugiere también que el paso de ruptura homolítica de $[MbFe^{III}(SH^-) \leftrightarrow MbFe^{II}(SH^\bullet)]$ es particularmente lento, ya que la inhibición de la autocatálisis disminuye drásticamente la velocidad de formación de $MbFe^{II}$ como producto.



Esquema 2.1. Inhibición competitiva de PBN sobre la formación de $HSSH^{\bullet-}$ como precursor de la formación de HSS^- como acelerador de la reacción de reducción de $MbFe^{III}$.

En consecuencia, lo que ha sido inhibido usando PBN no sería la homólisis sino la catálisis posterior, es decir, los pasos elementales en los que interviene $HS^\bullet$, que llevan a la conversión más rápida del complejo en $MbFe^{II}$.

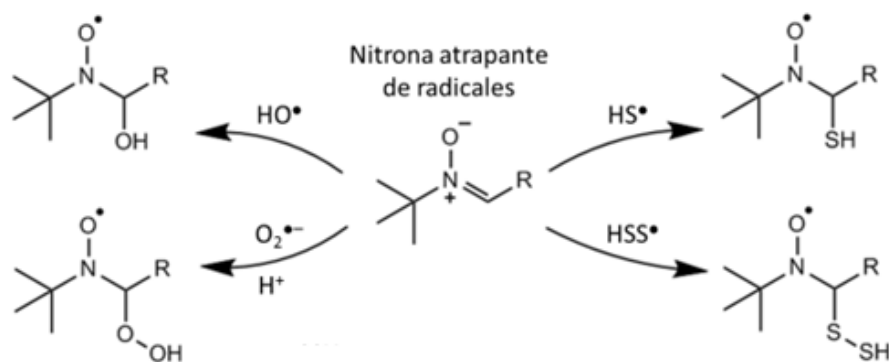
2.2.4 Evaluación teórica de la polaridad/selectividad de los atrapantes de radicales

Para evaluar la diferencia de reactividad observada en los experimentos de reducción de $MbFe^{III}$ por sulfuro en presencia de atrapantes de radicales, nos propusimos calcular teóricamente la diferencia de energía libre para la formación de los aductos.

Se estudiaron los casos de DMPO y PBN. Existen diferencias entre ambas nitronas: por un lado DMPO es menos hidrofóbico que PBN, y por otro lado la vida media de los aductos que forman con ciertos radicales es distinta.²⁵⁹ Sin embargo, no se conocen reportes sobre diferencias de factibilidad termodinámica de la adición de radicales inorgánicos de azufre. A este análisis teórico le incluimos una tercera nitrona, la etilen-terbutil-nitrona (EBN, *ethylene-tertbutyl-nitrone*) como modelo minimalista, ya que no posee sustituyentes en el carbono β al grupo nitrona.

Realizamos cálculos de optimización de geometría de DMPO, PBN, EBN, y los aductos radicalarios correspondientes. Para ello utilizamos solvente implícito (PCM) y por medio de teoría de funcional de la densidad electrónica (DFT, *Density Functional Theory*), utilizando el software Gaussian 9.²⁶⁶

Inicialmente optimizamos aductos de dos radicales oxigenados, $HO^\bullet$ y $O_2^\bullet$, a modo de validación del método ya que su adición a nitronas ha sido documentada.^{267,268} Como especies radicalarias azufradas seleccionamos $HS^\bullet$, y $HSS^\bullet$. El esquema 2.2 ilustra la estructura de una nitrona y los aductos correspondientes a los radicales ensayados.



Esquema 2.2. Nitrona atrapante de radicales y conversión en aductos tipo nitróxido.

Se emplearon distintas combinaciones de métodos y bases. Además, se llevaron a cabo los cálculos con dos constantes dieléctricas diferentes para el solvente implícito; se emplearon constantes dieléctricas de $\epsilon=78$ para el agua y $\epsilon=8$ para simular entornos hidrofóbicos.

Se presentan los resultados de los cálculos de energía libre por DFT utilizando el funcional de Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) y el conjunto de bases 6-31G** en la tabla 2.3.

	DMPO		PBN		EBN	
	$\epsilon=78$	$\epsilon=8$	$\epsilon=78$	$\epsilon=8$	$\epsilon=78$	$\epsilon=8$
$\text{HO}^\bullet$	-45.21	-45.69	-39.42	-39.56	-35.05	-35.42
$\text{O}_2^{\bullet-}$	No converge	No converge	5.81	3.96	7.52	6.11
$\text{HS}^\bullet$	-17.61	-17.84	-12.27	-12.51	-7.06	-7.41
$\text{HSS}^\bullet$	0.57	0.65	6.43	5.93	-2.43	-2.49

Tabla 2.3. Diferencia de energía libre de Gibbs entre reactivos y producto de adición en kcal/mol. Funcional PBE; conjunto de bases 6-31G**.

La polaridad del solvente implícito tiene un efecto modesto sobre los valores calculados. Se observa que para el radical $\text{HS}^\bullet$ las tres nitronas presentan energías favorables para formar el compuesto de adición. Más aún, se calcularon valores de ΔG más favorables para DMPO que para PBN. Los resultados para el radical $\text{HS}^\bullet$ no permiten establecer una distinción clara de reactividad entre DMPO y PBN, incluso al modificar la constante dieléctrica del medio.

Por un lado, las tendencias observadas de ΔG para la formación de los aductos radicalarios no permiten explicar las observaciones experimentales. Por lo tanto, se concluye en este caso que la reactividad cinética de los atrapanes de radicales no sería el factor determinante. El nivel de teoría y modelización del entorno pueden resultar insuficientes para evaluar la diferencia observada en los resultados experimentales.

Por otro lado, la reacción positiva del atrapanes de mayor carácter lipofílico PBN,²⁵⁹ y la negativa de los atrapanes menos hidrofóbicos DMPO y MV²⁺, sugiere que el atrapanes podría reaccionar con la especie radicalaria en el entorno proteico predominantemente hidrofóbico y que, en cambio, no estaría disponible para atrapanes que solo pueden reaccionar en el medio acuoso, por tener restringido su acceso a las cavidades proteicas. Los resultados experimentales de cinética de reducción de MbFe^{III} obtenidos en presencia de PBN sugieren entonces que la especie radicalaria permanece en la matriz proteica, donde continúa y completa su proceso reactivo.

2.2.5 Residencia de HS• en la matriz proteica

Teniendo en cuenta la afinidad por entornos no polares de PBN, consideramos como hipótesis que accede al interior de la matriz proteica y se encuentra con el radical HS• retenido dentro de ella, resultando en una disminución significativa de la velocidad para la reacción en presencia de PBN (sección 2.2.3). Para evaluar esta posibilidad, realizamos un estudio de residencia de radical sulfanilo en huecos hidrofóbicos que posee la MbFe^{III}.²⁶⁹ El cálculo fue realizado por el Grupo de Modelado Molecular de INQUIMAE.

La matriz proteica de la mioglobina contiene cavidades y canales que son los caminos posibles para acceder al sitio activo por parte de diferentes moléculas pequeñas.^{269–272} Estas cavidades son también capaces de alojar un átomo de Xe. La capacidad de alojar átomos de Xe ha sido explotada para identificar cavidades en proteínas, y a su vez para estudiar la interacción que pudieran establecer otras moléculas con dichas cavidades.²⁷³ Para el caso de mioglobina han sido reconocidos cuatro cavidades hidrofóbicas, mediante experimentos de rayos X.^{272,274,275} En este contexto, fue estudiada la reunión (*rebinding*) geminal de distintos ligandos de Mb y Hb mediante experimentos de cinética ultrarrápida por fotólisis

y relajación. Las cinéticas de reunión geminal de O_2 ,^{276,277} CO ,^{277–279} y NO^* ,^{280–282} presentaron perfiles cinéticos complejos que no eran explicados por modelos simples que involucraran únicamente la reunión del ligando o su escape al medio. Por el contrario, fueron propuestos distintos modelos cinéticos que contemplaban también la residencia de los ligandos en huecos hidrofóbicos de la proteína, así como la existencia de canales que los comunican, y que permitían explicar el comportamiento cinético multifásico de la reunión geminal.^{276,277,279} De estos análisis se desprende que no sólo existen varias cavidades accesibles, sino que también existen canales entre ellas y que esto configura distintas rutas que llevan a la retención o al escape del ligando. Estos resultados empíricos fueron sustentados también por resultados teóricos de dinámica molecular para la interacción entre NO^* con Hb truncada de *Mycobacterium tuberculosis*, y mioglobina.^{282,283}

Con estos experimentos como antecedentes, evaluamos computacionalmente la posibilidad de situar al radical HS^* en cualquiera de las cuatro cavidades de Xe de la mioglobina ferrosa. Una hipótesis de trabajo incluye la posibilidad de que el radical HS^* , cuyo tamaño es comparable al del átomo de Xe (140 pm),²⁸⁴ migre luego de formarse por oxidación de HS^- coordinado seguida de homólisis, y resida en los bolsillos de Xe que tiene la $MbFe^{II}$. Para este estudio, se utilizó la estructura cristalina 1WLA de la mioglobina ferrosa del banco de datos de proteínas (PDB, *protein data bank*).

La figura 2.21 presenta los resultados del análisis de cuatro simulaciones MD independientes de $MbFe^{II}$, cada una incorporando una única molécula HS^* en uno de los sitios Xe, etiquetados como sitios Xe I a IV.

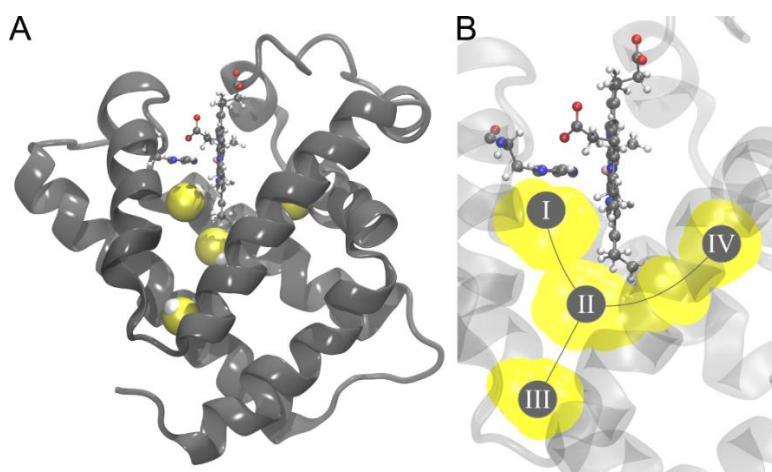


Figura 2.21. Visualización de la mioglobina y la interacción de HS mediante MD. (A) Estructura representativa de la estructura MbFe^{II} en solución acuosa. El grupo hemo y el residuo proximal de histidina se muestran en representación de esferas y bastones, mientras que la proteína se muestra en cintas. Se muestran los radicales HS* que ocupan huecos hidrofóbicos caracterizados experimentalmente como sitios Xe en experimentos de cristalografía de rayos X y representan la superposición de imágenes representativas de 4 simulaciones MD independientes. (B) La dinámica del radical HS* en la matriz de mioglobina se representa mediante una colección de círculos amarillos, que superponen los resultados de 4 simulaciones MD independientes, y dan lugar a zonas amarillas que resaltan la conectividad entre las cavidades hidrofóbicas.*

Los residuos que estuvieron, en promedio, a distancias menores a 5 Å del HS* fueron Leu87, His93, Leu104 y Phe138 para el sitio I; Leu104, Ser108, Leu135 y Phe138 para el sitio II; Ile75, Leu76, His82, Ala134 y Leu137 para el sitio III; y Val28, Leu29, Leu69 e Ile111 para el sitio IV. En todos los casos, observamos que el radical HS* resultó predominantemente confinado dentro de estos bolsillos, migrando ocasionalmente a un sitio adyacente, y siendo capaz de escapar al medio sólo en una de las cuatro simulaciones, después de 40 ns de MD sin restricciones. Observamos también conexiones entre los sitios I, II y IV (Figura 2.21, panel B), en consonancia con las observaciones reportadas para Xe y CO.^{269–272} La migración de HS* entre los sitios III y II no resultó significativa, probablemente debido a la escala de tiempo de la simulación.

Interesantemente, en cada caso, el radical HS* se ubicó en las cavidades sin una orientación preferencial del enlace S-H, lo que pone de relieve la naturaleza hidrofóbica de la

interacción. Aunque son necesarias simulaciones más extensas para una evaluación cuantitativa del tiempo de residencia del HS• en la matriz MbFe^{II}, estas simulaciones MD proporcionan apoyo a la hipótesis de residencia de HS• dentro de la matriz proteica, del mismo modo que los estudios precedentes con NO•.

El estudio realizado no permite descartar la posibilidad de interacciones no específicas adicionales del radical HS• con la superficie de la proteína, como ha sido informado experimentalmente para el Xe y la mioglobina.²⁸⁵

Los resultados sugieren que el radical puede residir en las cavidades de Xe, que son de naturaleza hidrofóbica ya que HS• no presenta una orientación espacial definida pese a tener un dipolo débil. La lipofilia del PBN y esta evaluación teórica del entorno proteico, permiten en principio proponer que la diferencia observada en la captura de radicales por los distintos atrapantes ensayados puede atribuirse a la residencia del radical HS• dentro de la matriz proteica. En conjunto, estos resultados resaltan el papel necesario de este radical en la autocatálisis de la reducción de MbFe^{III}.

Experimentalmente, la residencia del radical HS• dentro o fuera de una matriz proteica ha sido evaluada por su capacidad de persulfidar el grupo tiol de albumina sérica humana (HSA, *human serum albumin*).¹⁹³ El método de cambio de etiqueta (*tag-switch*), fue empleado para evaluar el grado de persulfidación (grupos RSSH) de HSA,^{286–288} luego de la reacción entre H₂S y cyt c-Fe^{III} o MbFe^{III}. El método tag-switch consiste en la marcación de los grupos tiol y persulfuro de una proteína con metilsulfonil-benzotiazol (MSBT), que se une de forma no selectiva, para luego sustituirlo por un agente selectivo que reemplaza al MSBT únicamente en las posiciones persulfidadas.²⁸⁷

Las reacciones 2.16 y 2.17 ilustran el proceso para el ejemplo de la persulfidación de HSA mediante los radicales HS• generados por oxidación de H₂S con cyt c-Fe^{III}.



Los autores observaron un grado de persulfidación significativa en la HSA luego de la reacción de cyt c-Fe^{III} con H₂S. En cambio, el resultado para MbFe^{III} como generadora de HS•

para persulfidar los tioles de cisteínas de HSA resultó negativo. Los autores concluyen que debido a la ausencia de persulfidación, el radical $\text{HS}^\bullet$ formado por oxidación de HS^- por MbFe^{III} no es liberado a la solución, lo cual es consistente con la residencia en la matriz proteica.

No obstante, cabe destacar que los experimentos reportados fueron realizados en condiciones estequiométricas a sub-estequiométricas, y no en condiciones de exceso de sulfuro, como las que empleamos en nuestros experimentos. Los tiempos de incubación también fueron menores, incluso posiblemente insuficientes para verificar los resultados con MbFe^{III} .¹⁹³

Por cuestiones de disponibilidad y costo, no fue posible replicar los experimentos de cambio de etiqueta en nuestro laboratorio, con el objetivo de reproducir las mismas condiciones experimentales que evaluamos por espectroscopía para comparar los resultados, al menos cualitativamente.

Dados los resultados reportados por el método de la persulfidación de albúmina para $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$ y MbFe^{III} , exploramos con fines comparativos la acción de PBN, DMPO y MV^{2+} sobre la reacción de $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$ y sulfuro. Los experimentos cinéticos de agregado de solución de Na_2S sobre $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$ en presencia o ausencia de los atrapanes de radicales muestran diferencias respecto de los experimentos con MbFe^{III} . En este caso, se observó una disminución de la velocidad de la reacción global con DMPO y MV^{2+} , pero no con PBN (figura 2.22).

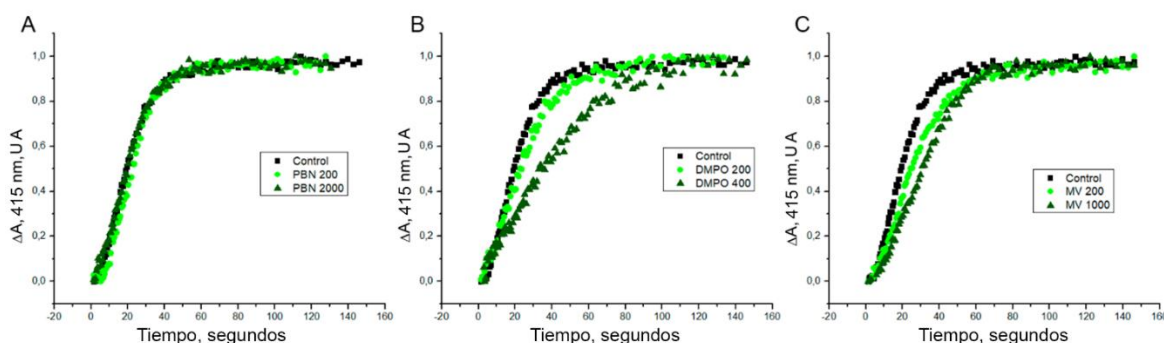


Figura 2.22. Trazas cinéticas de absorbancia a 415 nm para $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$ 10 μM tras la adición de Na_2S $R_{\text{S}}/\text{Fe}=50$ (500 μM) en ausencia o presencia de PBN, DMPO y MV^{2+} . Condiciones anóxicas, $\text{pH}=7.4$, $T=25^\circ\text{C}$. A) Control (negro), PBN 1.6 mM (verde claro), PBN 16 mM (verde oscuro). B) Control (negro),

DMPO 1,6 mM (verde claro), DMPO 3.2 mM (verde oscuro). C) Control (negro), MV²⁺ 1.6 mM (verde claro), MV²⁺ 8,0 mM (verde oscuro).

Las diferencias de reactividad de estos compuestos atrapantes de radicales cobran sentido al reunirlos con las evidencias de migración de ligandos neutros dentro de la matriz proteica,^{276–279,282} los cálculos computacionales reportados para otros ligandos,^{282,283} y nuestros cálculos para el caso particular de MbFe^{II} y HS[•]. El entorno que ofrece cada proteína resulta un diferencial para la reactividad de estas especies.²⁸⁹ En conclusión, la MbFe^{II} ofrece un entorno de residencia temporal para HS[•], que a la luz de la interrupción de la autocatálisis por presencia de PBN, sería un radical clave en el mecanismo global.

2.2.6 El hidrodисульфuro, HSS⁻, como intermediario de la reducción de MbFe^{III} por sulfuro

Para evaluar la participación de HSS⁻ en la reacción de reducción de MbFe^{III} mediada por sulfuro, se sintetizó la sal disódica de disulfuro (Na₂S₂) adaptando un protocolo reportado,¹³⁷ para utilizarla como reductor en condiciones anóxicas. La caracterización del producto por derivatización con BzCl y espectroscopía RMN resultó en un 97% de Na₂S₂, con una impureza de un 3% de Na₂S₃, en base a la integración del espectro ¹H.

La reacción de HSS⁻ y MbFe^{III} fue estudiada en condiciones anóxicas, T=25°C, pH = 7.4. La relación molar HSS⁻/MbFe^{III} se notará R_{SS/Fe}, análogamente a la notación R_{S/Fe} para sulfuro. A los fines comparativos, se realizaron en iguales condiciones experimentos con sulfuro y disulfuro (R_{S/Fe} = 50 y R_{SS/Fe} = 50). En ambos casos la reacción da como producto MbFe^{II} a una velocidad mayor para disulfuro.

En la Figura 2.23 se puede observar cómo se comparan las trazas cinéticas del agregado de sulfuro o disulfuro como reductores de MbFe^{III}. Mientras que el primero completa la conversión de MbFe^{III} en MbFe^{II} en ≈3000 s, el segundo lo hace en ≈300 s.

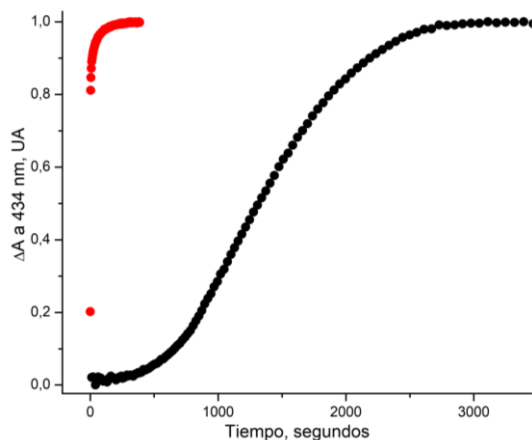


Figura 2.23. Trazas de absorbancia normalizada a 434 nm para MbFe^{III} 10 μM luego del agregado de Na₂S 500 μM (negro, $R_{S/Fe} = 50$) o Na₂S₂ 500 μM (rojo, $R_{SS/Fe} = 50$), anóxico, 25°C.

Mientras que la reducción de MbFe^{III} por sulfuro presenta la cinética sigmoidea ya descripta (sección 2.1), el experimento análogo utilizando HSS⁻ presenta una traza cinética de forma biexponencial y más rápida. En base a lo observado, tentativamente proponemos un paso de coordinación y un segundo paso de transferencia electrónica (reacciones 2.18 e 2.19).



Estos resultados permiten proponer al HSS⁻ como potencial intermediario catalítico en la reducción de MbFe^{III} mediada por sulfuro, en virtud de la posible formación del HSS⁻ en el medio de reacción cuando el reductor es sulfuro,^{141,200} y de que es capaz de promover la formación del mismo producto final, MbFe^{II}, a una velocidad significativamente mayor. La reactividad y comportamiento particular del disulfuro frente a MbFe^{III} está presentada en el Capítulo 3. El comportamiento catalítico deviene en la posibilidad de que el azufre oxidado regenere HSS⁻ al menos parcialmente, aumentando la concentración disponible y por lo tanto la aceleración del proceso global.

En la mayoría de los experimentos de reacción de MbFe^{III} con sulfuro, el complejo MbFe^{III}(HS⁻) se forma rápidamente y se convierte en la especie mayoritaria de la proteína. Por esta razón, estudiamos la interacción de HSS⁻ con el complejo MbFe^{III}(HS⁻). El agregado

de HSS^- ($R_{\text{SS}/\text{Fe}}=10$) a una solución de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HS}^-)$ ($R_{\text{S}/\text{Fe}}=100$, pH 7.4, $T=25^\circ\text{C}$) mostró que la reacción era incluso más rápida que para $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$, como se muestra en la figura 2.24.

El resultado experimental revela que, en las condiciones de reacción seleccionadas, la adición de solución de Na_2S_2 sobre $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HS}^-)$ sigue un crecimiento sigmoideo formando MbFe^{II} , con una velocidad que duplica aproximadamente la velocidad de la reacción sobre $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$, lo que apunta a un comportamiento diferencial del disulfuro frente al complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HS}^-)$ en comparación con el complejo de partida, $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$.

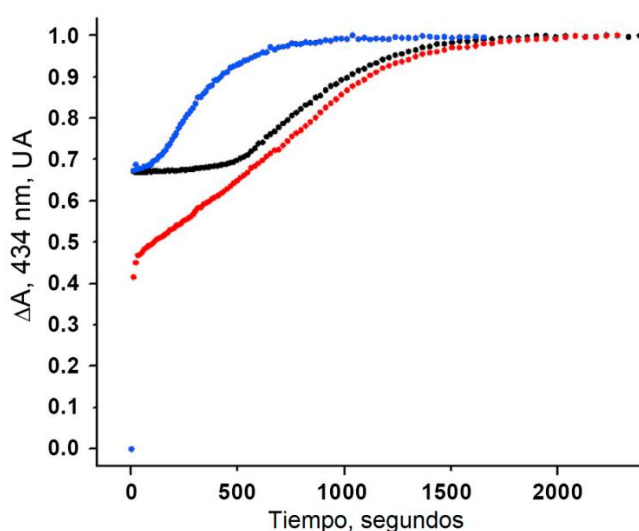


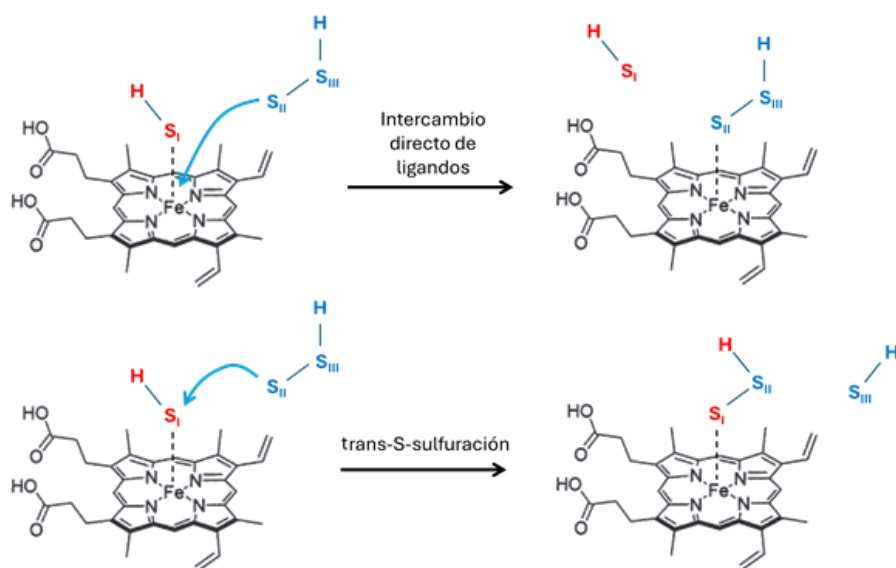
Figura 2.24. Cambios normalizados de absorbancia a 434 nm para $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ tras la adición de Na_2S_2 ($R_{\text{SS}/\text{Fe}}=10$), bajo argón, $T=25^\circ$ (círculos azules). Experimentos de control de la adición de Na_2S ($R_{\text{S}/\text{Fe}}=100$) o Na_2S_2 ($R_{\text{SS}/\text{Fe}}=10$) a MbFe^{III} (círculos negros y rojos, respectivamente).

Este resultado apoya la propuesta de HSS^- como un intermediario activo de reacción en la reducción de MbFe^{III} por medio de sulfuro y, además, muestra un comportamiento sinérgico de estas especies en la reducción del hierro del hemo.

2.2.7 Evaluación teórica del sinergismo entre HS^- y HSS^- : hipótesis de trans-S-sulfuración

A partir del comportamiento sinérgico observado entre HS^- y HSS^- , comparamos dos posibles mecanismos que podrían mediar en la interacción entre $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ y HSS^- . Por un

lado, tuvimos en cuenta un proceso de intercambio de ligandos directo. Por otro lado, evaluamos la posibilidad de que suceda la transferencia de un átomo de S del HSS^- (que llamaré S_{II}) hacia el sulfuro coordinado (esquema 2.3). Esta última sería una trans-S-sulfuración y se asemeja conceptualmente a las transpersulfidaciones de tioles.¹⁷ Se etiquetan los átomos de azufre como S_{I} para HS^- , y S_{II} y S_{III} para HSS^- .



Esquema 2.3. Mecanismos de intercambio directo y trans-S-sulfuración. Los átomos del ligando HS^- unido inicialmente al hierro aparecen en rojo; los átomos del HSS^- inicialmente libre aparecen en azul. Se etiquetan los átomos de azufre como S_{I} para HS^- , y S_{II} y S_{III} para HSS^- .

Para evaluar teóricamente ambas hipótesis utilizamos el método de la banda elástica desplazada (NEB, *nudged elastic bands*). Este método calcula trayectorias de energía mínima y estados de transición en sistemas complejos mediante la conexión de estados intermedios entre reactivos y productos, utilizando algoritmos y técnicas para mejorar la precisión, la eficacia y la convergencia en diversas aplicaciones.^{170,290}

El algoritmo de NEB utiliza como punto de partida las estructuras de los reactivos y productos, aún sin conocer las coordenadas de reacción. Inicialmente establece una trayectoria entre reactivos y productos, con una cantidad finita de puntos que llamaremos imágenes. La trayectoria inicial, construida por interpolación lineal (u otro método) suele ser diferente de la trayectoria de energía mínima que se obtiene al optimizarla (Figura 2.25).

Sin embargo, la optimización directa de las configuraciones intermedias no es adecuada: estas configuraciones inestables descenderían por la superficie de energía potencial hacia el estado estable más cercano, es decir, el estado inicial o final que son mínimos locales.

En el método NEB, las configuraciones intermedias se unen mediante resortes, de modo que siempre están obligadas a permanecer entre su imagen anterior y posterior. Entonces las configuraciones actúan como una cadena elástica.

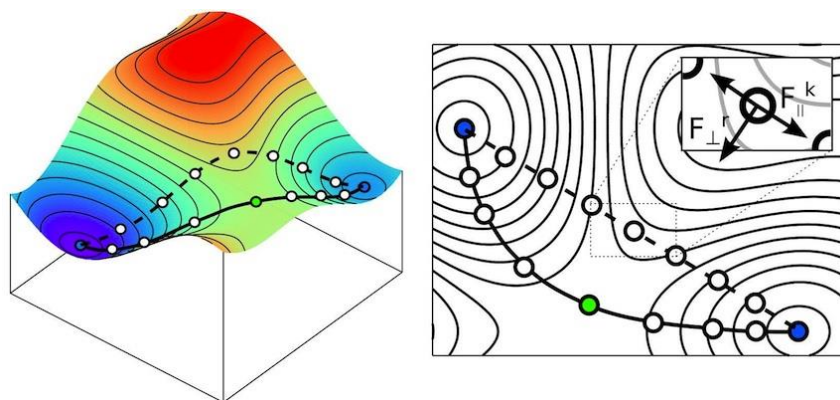


Figura 2.25. Método NEB. Superficie de energía potencial esquemática (izquierda) y trayectorias inicial y optimizada (derecha).

De la fuerza real que se aplica a los átomos, sólo se utiliza la componente normal a la trayectoria de reacción ($F_{\perp}$). A lo largo de la trayectoria de reacción es la fuerza debida a los resortes la que se aplica a los átomos ($F_{\parallel}^k$). El cálculo NEB se detiene cuando la suma de estas fuerzas es cero o cae por debajo de un determinado criterio de convergencia. Usualmente cuando esto sucede, se alcanza una posible trayectoria de mínima energía potencial, que puede no ser única.

Los cálculos de esta sección fueron realizados con el software ORCA, tanto para la optimización de estructuras como para los cálculos de NEB. Como modelo de MbFe^{III}(SH⁻) se empleó una porfirina sin sustituyentes, P, con N-metil-imidazol como ligando proximal mimetizando a la histidina, y SH⁻ como ligando distal, PFe^{III}(SH⁻). Fijamos el estado de espín del sistema en bajo espín ($1/2$, $S = 2$).

El estado inicial del sistema consiste en el complejo PFe^{III}(SH⁻) y una molécula de HSS⁻ ubicada a 5 Å, orientando el átomo de S_{II} desprotonado hacia el hierro hémico. La estructura

de partida fue optimizada satisfactoriamente utilizando el funcional PBE0 y el conjunto de bases 6-311++G(2df,2p).

Para los estados finales construimos diferentes formas del complejo $\text{PFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$, debido a que para el algoritmo NEB los átomos son distinguibles a partir de su número de etiquetado en los archivos de coordenadas. También esto es clave para definir las coordenadas de reacción que se utilizan al construir el camino inicial que se optimizará. Las estructuras optimizadas de reactivos y productos se presentan en la figura 2.26.

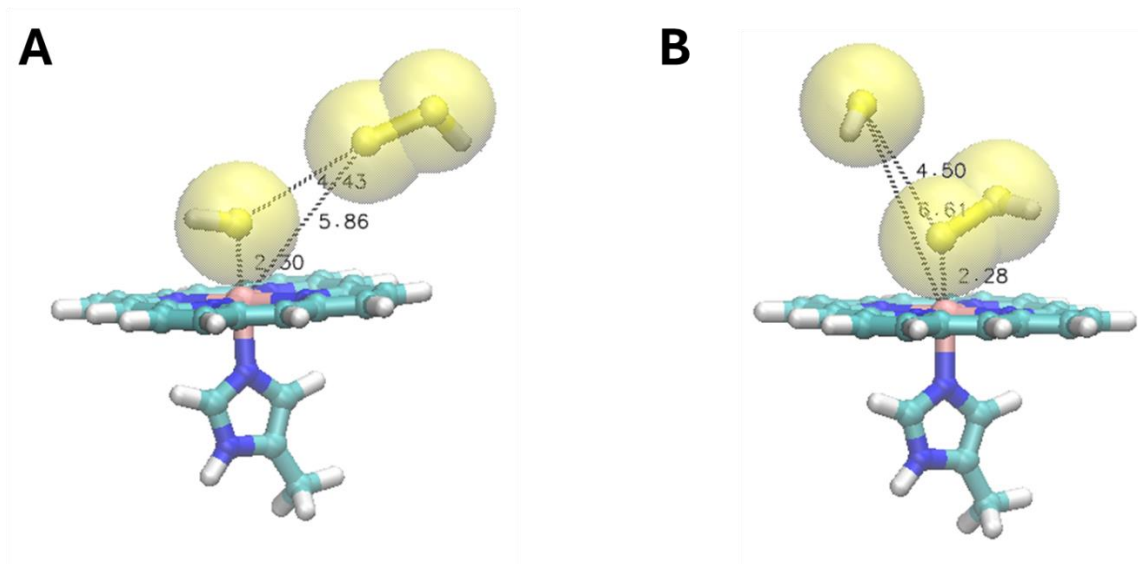


Figura 2.26. Estructuras optimizadas para los reactivos (A) y productos (B) de la conversión de $\text{PFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ a $\text{PFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ por intercambio directo o *trans*-S-sulfuración. La optimización fue realizada a nivel de teoría PBE0/6-311++G(2df,2p).

En el caso del intercambio directo de ligandos, se intercambiaron los ligandos completos, mientras que para la *trans*-S-sulfuración, se transfirió un átomo de azufre del HSS^- libre al ligando HS^- original, tal como ilustra el esquema 2.3. Como el estado final construido de esta manera tiene el átomo de H unido al S coordinado, agregamos un paso adicional para transferirlo al S más alejado del Fe. Los resultados de las curvas obtenidas como camino de mínima energía potencial se muestran en la figura 2.27.

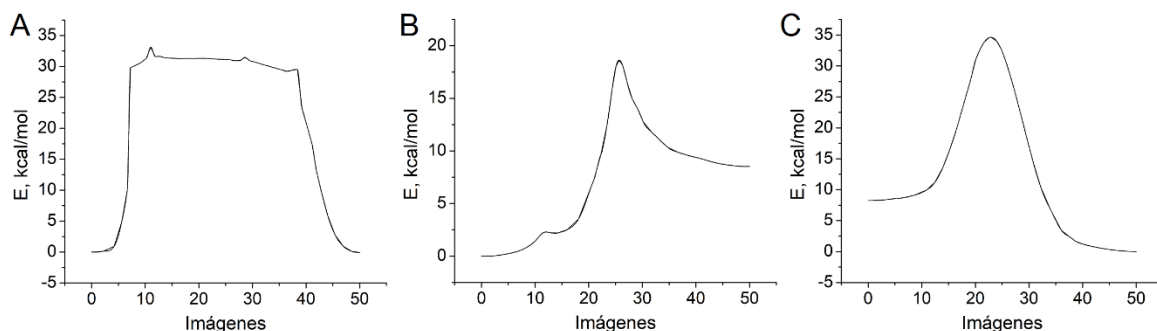


Figura 2.27. Camino de mínima energía potencial obtenido por NEB para A) el intercambio directo de ligandos entre $MbFe^{III}(SH^-)$ y HSS^- ; B) la trans-S-sulfuración; C) El intercambio de protón entre el átomo S coordinado y el átomo S transferido en la trans-S-sulfuración.

En el intercambio de ligandos se observa una barrera de activación relativamente alta, de 32 kcal/mol. La curva aumenta abruptamente su energía en las primeras imágenes y desciende también de forma repentina en las últimas. El cambio en la distancia Fe-S_I de 2.3 a 2.7 Å produce un aumento de 30 kcal/mol. Del mismo modo, la disminución de la distancia Fe-S_{II} de 2.7 a 2.4 Å produce una disminución abrupta de la energía. Ambos cambios de energía se corresponden con la ruptura y la formación de los enlaces Fe-S correspondientes, poniendo de manifiesto la magnitud de la energía del enlace de coordinación. Las imágenes intermedias corresponden al acercamiento de HSS^- y retirada de HS^- sin cambios significativos en la energía del sistema, dando al perfil de energía potencial una forma de meseta. Esto significa que a distancias mayores a 2.7 Å la interacción Fe-S es débil. El hecho de que el HS^- se separe previo al acercamiento del HSS^- con saltos energéticos de estas características sugiere un mecanismo de intercambio disociativo. Otra observación interesante es que al alejarse el átomo S_I de Fe, el metal se acerca levemente al átomo de N del N-metil-imidazol proximal, y restituye su posición original al interactuar con el átomo S_{II} del HSS^- que se aproxima.

El perfil de energía para la trans-S-sulfuración muestra una barrera de activación de 18.6 kcal/mol, con un máximo de energía en las imágenes intermedias de la banda. El perfil muestra un máximo, como candidato a estado de transición. La estructura correspondiente al máximo de energía posee los tres átomos de S concatenados con distancias de enlace S_I-S_{II} y S_{II}-S_{III} de 2.56 y 2.40 Å respectivamente. En la imagen siguiente, los valores de dichas

distancias se invierten y S_{II} se encuentra a distancia menor de S_I que de S_{III} , con lo cual inicia la transferencia de S_{II} .

La estructura final posee mayor energía que la inicial debido al protón que está ubicado en el átomo de S_I próximo al hierro en lugar de estar unido al átomo S_{II} . Se calculó como paso auxiliar la traslocación del protón (figura 2.27, panel C) y se obtuvo un perfil de energía potencial con una energía final menor, que compensa esa diferencia observada. Cabe destacar que este cálculo es auxiliar para corroborar que la trans-S-sulfuración arriba a un mínimo de energía de productos similar al del intercambio de ligandos. La barrera energética alta que se observa en el cálculo de este paso auxiliar no tiene sentido físico puesto que la transferencia de protón en el sistema real es probablemente asistida por el entorno proteico o moléculas de agua que faciliten los intercambios de protones necesarios, que en esta simulación no se incluyeron de forma explícita. Una descripción más completa del fenómeno requeriría la inclusión de la proteína completa y la solvatación con moléculas de agua clásicas, realizando una rutina NEB con niveles de teoría híbridos QM/MM, de mayor complejidad y costo computacional.

Es importante tener en cuenta que las curvas obtenidas son de energía potencial y no de energía libre, debido a que no está siendo contemplada la componente entrópica del sistema, lo cual requeriría un costo computacional mucho mayor. La barrera de 18.6 kcal/mol que observamos para la trans-S-sulfuración es comparable a la energía de disociación de la molécula de H_2O en $MbFe^{III}(H_2O)$ ($k_{off} = 6300\ s^{-1}$; $E_a = 12.3\ kcal/mol$ según la ecuación de Eyring).²⁰² Teniendo en cuenta que los mecanismos de intercambio de ligandos requieren la disociación del agua, este resultado por comparación sugiere que la barrera energética es accesible.

En conclusión, observamos computacionalmente que la trans-S-sulfuración es energéticamente menos costosa que el intercambio directo de ligandos, a nivel de teoría PBE0/6-311++G(2df,2p), por un margen de más de 10 kcal/mol. Por lo tanto es un mecanismo plausible para la interacción entre $MbFe^{III}(SH^-)$ y HSS^- . Esto es consistente con la aceleración relativa observada experimentalmente, presentada en la sección 2.2.6. La transferencia de un átomo de S no requiere la ruptura del enlace de coordinación Fe-S del

complejo inicial y tiene teóricamente menores requerimientos de migración para el HSS^- dado que la aproximación entre los átomos de S de los ligandos es suficiente. La evaluación de estos mismos procesos con la proteína completa utilizando dinámicas moleculares y NEB, con cálculos híbridos QM/MM, representaría un nivel de análisis superior para este mecanismo propuesto.

2.2.8 Presencia de polisulfuros como productos azufrados finales

Para determinar la presencia de polisulfuros como productos de oxidación del sulfuro, realizamos determinaciones analíticas. Puntualmente utilizamos la técnica de cianólisis en frío y el método de azul de metileno.

Cianólisis en frío

Para la cianólisis en frío, realizamos previamente una calibración con soluciones de SCN^- de concentraciones dentro del rango de respuesta lineal de la técnica, que comprende de 10 a 1000 μM ,¹⁴¹ en iguales condiciones que el ensayo con alícuotas de la mezcla de reacción.

La cianólisis se realizó sobre la mezcla de reacción con $[\text{MbFe}^{\text{III}}]_0 = 100 \mu\text{M}$, $R_{\text{S/Fe}} = 100$ a pH 7.4 en atmósfera de argón, una vez observada la reducción a MbFe^{II} . Los resultados de este ensayo no fueron satisfactorios. No se observó una absorción significativa a 460 nm, correspondiente a $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{SCN}^-)]^{2+}$, luego del tratamiento de las muestras.

Como control adicional se realizó el protocolo de cianólisis sobre soluciones de Na_2S_2 de concentraciones conocidas de $10 \mu\text{M} \leq [\text{HSS}^-] \leq 500 \mu\text{M}$. Sólo se obtuvo absorción significativa por tratamiento de una solución con una concentración analítica $[\text{HSS}^-] = 500 \mu\text{M}$, la cual no es cuantitativa. En base a la curva de calibración de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{SCN}^-)]^{2+}$, la señal observada correspondería a 10 μM , que es el 2%, y es atribuible a las impurezas de Na_2S_3 provenientes de la síntesis de Na_2S_2 .

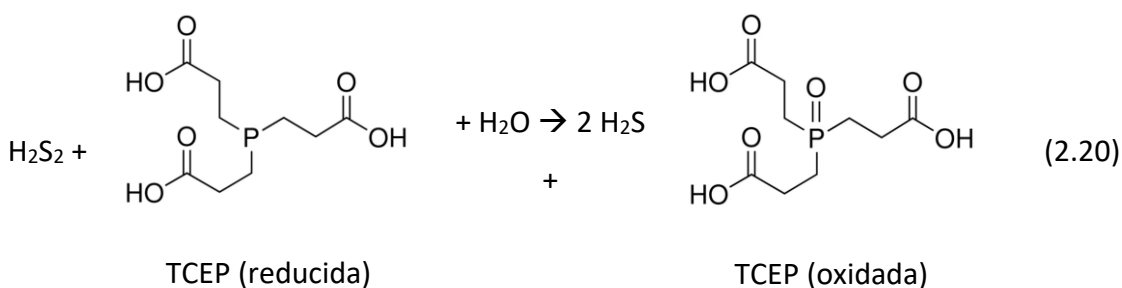
La técnica de cianólisis no resultó útil para evaluar la presencia de HSS^- como producto final o como intermediario en los sistemas evaluados, puesto que el desarrollo colorimétrico observado no es cuantitativo. Más aún, los experimentos control revelaron que la señal observada se corresponde con impurezas minoritarias de Na_2S_3 , observadas también en el

control de derivados bencílicos de Na₂S₂ sintético, controlados por ¹H RMN. Concluimos que la detección de HSS⁻ por cianólisis no es posible, ya que no resulta reactivo a diferencia de los polisulfuros superiores con 3 o más átomos de S. La cantidad de polisulfuros inorgánicos superiores esperada está limitada por la estequiometría de la reacción y probablemente por debajo del límite de detección.

Azul de metileno

En el caso de la técnica de cuantificación por formación de azul de metileno, realizamos calibraciones con soluciones de concentración conocida de sulfuro y de disulfuro. La sensibilidad de la técnica resultó diferente para cada uno de ellos, obteniendo experimentalmente una sensibilidad mayor para H₂S que para HSS⁻.

Esa diferencia en sensibilidad posibilita la cuantificación de azufre oxidado en estos sistemas de una forma económica. Adicionalmente, la reducción de las RSS oxidadas obtenidas por medio del agregado de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, *tris(2-carboxyethyl)phosphine*) permite convertirlas en sulfuro y cuantificar la diferencia en la colorimetría (reacción 2.20). El protocolo de trabajo se detalla en la sección 2.5.1.



Evaluamos la formación de HSS⁻ como producto de la reducción anóxica de MbFe^{III} por sulfuro (R_{S/Fe} = 5, pH 7.4), mediante la recuperación de sulfuros tras la reducción del HSS⁻ esperado con TCEP. Luego, realizamos el ensayo colorimétrico de azul de metileno sobre alícuotas del medio de reacción. La figura 2.28 muestra los experimentos de control en ausencia sulfuro (Control -) o en ausencia de MbFe^{III} (Control +), que proporcionan las condiciones limitantes del ensayo.

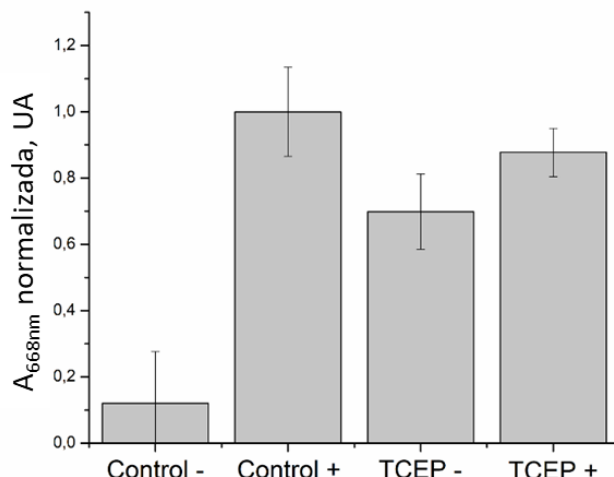


Figura 2.28 Efecto del TCEP sobre el contenido final de sulfuro y disulfuro, determinado por el ensayo de azul de metileno, tras finalizar la reducción de MbFe^{III} por sulfuro ($R_{S/Fe} = 5$, pH 7.4). Las barras muestran el resultado de los experimentos de control en ausencia de sulfuro (Control-), en ausencia de MbFe^{III} (Control+), y tras la reducción de MbFe^{III} en ausencia (TCEP-) y en presencia (TCEP+) de TCEP. Los datos representan el resultado de tres o más experimentos independientes, con su desvío estándar.

La absorbancia normalizada a 668 nm correspondiente al azul de metileno para el experimento *control +* muestra la detección de la cantidad total de sulfuro añadido, y el *control -* muestra la detección espuria a 668 nm del sistema en ausencia de sulfuro añadido. La adición de TCEP al medio de reacción (TCEP+) revela la detección de una mayor cantidad de sulfuro que el experimento en el que la solución de TCEP se sustituye por un volumen igual de buffer (TCEP-).

La adición del agente reductor TCEP seguida de la detección mediante el ensayo con azul de metileno detecta aproximadamente el 87% de la cantidad total de sulfuro $132 \pm 11 \mu\text{M}$, mientras que el ensayo en ausencia de TCEP detecta $105 \pm 17 \mu\text{M}$ de sulfuro. El ensayo en ausencia de TCEP revela un consumo de $27 \mu\text{M}$ de sulfuro, de acuerdo con el consumo de 1 equivalente de sulfuro / mol de proteína.

La evaluación de la formación de polisulfuros como productos finales de la reducción anóxica de MbFe^{III} con sulfuro ($R_{S/Fe} = 5$, pH 7.4), permitió la recuperación de sulfuros tras la reducción de los polisulfuros con TCEP.

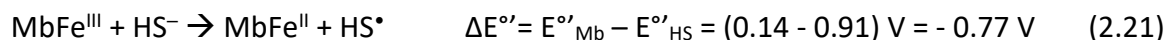
2.3 Mecanismo de reducción de MbFe^{III} mediada por Sulfuro

2.3.1 Propuesta mecanística de la reducción autocatalítica de MbFe^{III} mediada por H₂S

En base a las evidencias cinéticas, químicas y espectroscópicas, construimos una propuesta mecanística de reacción que se ajusta a los resultados obtenidos usando diferentes proporciones de sulfuro a MbFe^{III}, evaluadas dentro del intervalo de $6.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$ bajo atmósfera de argón.

El complejo MbFe^{III}(SH⁻) está activado

El complejo rápidamente formado puede ser descrito como la contribución de dos formas resonantes, MbFe^{III}(SH⁻) y MbFe^{II}(SH[•]), tal como hemos descrito en la introducción (sección 1.4.1). En nuestra propuesta mecanística interpretamos el complejo en términos de la estructura electrónica resonante [MbFe^{III}(SH⁻) $\leftrightarrow$ MbFe^{II}(SH[•])]. En virtud de esta hipótesis, proponemos que la unión al hierro activa al ligando azufrado. Esto podría explicar por qué en ausencia de cualquier otra especie activa redox (por ejemplo, O₂) la reacción de reducción ocurre, pese a que termodinámicamente sería desfavorable en términos de los potenciales formales reportados a pH = 7, que son para las especies azufradas libres (reacción 2.21).



El potencial del sulfuro ha sido medido para distintos oxidantes, pero en todos los casos el valor reportado refiere a las RSS en el medio, rodeadas por el solvente.^{17,47,48} No está reportado el potencial redox de la cupla HS[•]/HS⁻ cuando se encuentra como ligando de hemoproteínas. Es plausible pensar que la reacción se vea favorecida para estos compuestos teniendo en cuenta el carácter nucleofílico de HS⁻ y que Fe^{III} es un excelente electrófilo; además la alta polarizabilidad del átomo de S contribuye a la transferencia de carga parcial. Esta contribución de especies Fe^{II}(SH[•]), que consideramos consecuencia de lo dicho, ya ha sido considerada por otros autores.^{141,175,187}

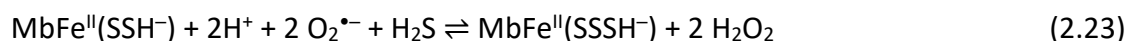
Reducción inicial lenta

Experimentalmente se observa que la reducción comienza muy lentamente en todas las condiciones experimentales (sección 2.1). La formación lenta de MbFe^{II} con el aumento de A₄₃₄ es la consecuencia de la ruptura homolítica del complejo [MbFe^{III}(SH⁻) $\leftrightarrow$ MbFe^{II}(SH[•])], que libera HS[•]. En solución metanólica ha sido reportada también la ruptura homolítica de complejos Fe^{III}(SH⁻) a partir de porfirinatos solubles.^{174–176}

A partir de esta ruptura homolítica del complejo inicial, que hemos señalado como el limitante del proceso global (figura 2.12, sección 2.1.3), son dos cuestiones las que merecen ser explicadas claramente en la propuesta mecanística: el destino del radical, y la identidad de las especies que aceleran la reducción de la proteína.

MbFe^{II} no coordina especies azufradas

En reportes previos fue propuesto que la formación de polisulfuros en la reacción entre Na₂S y MbFe^{III} se produce por concatenación de átomos de azufre sobre el azufre coordinado a una forma ferrosa de la proteína (reacciones 2.22 y 2.23).^{141,184,200}



Esto podría explicar la baja detección de las técnicas analíticas en base a un impedimento del encuentro entre los reactivos. La discusión en torno al destino e identidad de las especies oxidadas de azufre que se generan en condiciones anóxicas es de interés para proponer un mecanismo consistente con los resultados experimentales, teniendo en cuenta que en la reacción 2.23 participa el radical O₂^{•-}. En el contexto de este trabajo de Tesis intentamos verificar la formación de complejos de MbFe^{II}, con HS⁻ o HSS⁻ como ligandos en condiciones anóxicas. La espectroscopía UV-Vis sugería la formación de MbFe^{II}, pentacoordinada y de alto espín, como forma final del hierro hémico.

Para evaluarlo recurrimos a la espectroscopía Raman resonante (RR, *Resonance Raman*)², útil como herramienta espectroscópica para estudiar la estructura del hemo, el estado de espín y el estado redox del centro metálico. En particular, en la zona de alta frecuencia se registran bandas que se corresponden con modos normales estructurales (denominados *skeletal* o *marker modes*), documentados en la literatura y que sirven de referencia porque son particularmente sensibles al estado del hierro hémico. Los modos estructurales son ν_2 , ν_3 , ν_4 y ν_{10} .^{291,292}

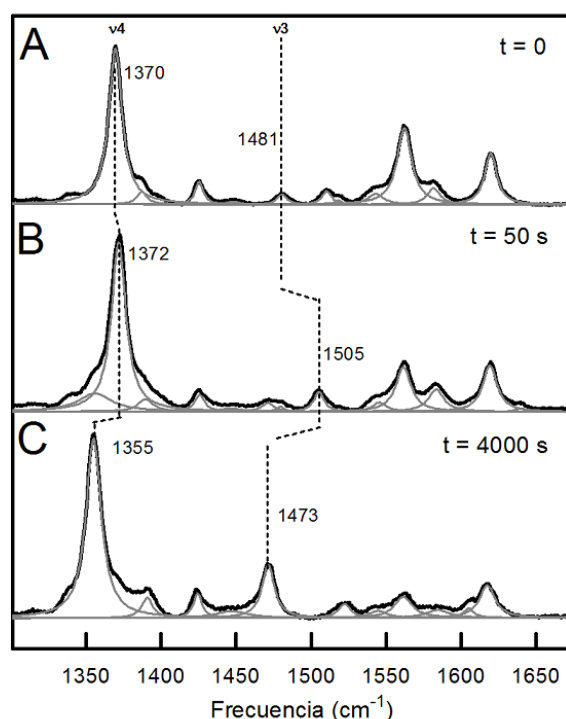


Figura 2.29. Deconvolución espectral de los espectros RR registrados para la reacción de MbFe^{III} $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ con Na_2S ($R_{\text{S/Fe}} = 100$), a $\text{pH} = 7.4$, 25°C , en condiciones anóxicas. (A) MbFe^{III} , (B,C) 50 y 4000 s después de la adición de la solución de Na_2S , respectivamente.

² Los estudios espectroscópicos de RR fueron realizados con la Dra. Magalí Scocozza y el Dr. Daniel Murgida, del Laboratorio de Espectroscopía Raman, INQUIMAE-CONICET.

La figura 2.29 representa los desplazamientos de los picos RR para la adición de Na₂S a MbFe^{III} 8x10⁻⁴ M, R_{S/Fe} = 100, a pH=7.4, 25°C, en condiciones anóxicas. El protocolo experimental detallado se encuentra en la sección 2.5.1. Las frecuencias de los modos normales al inicio y tras la adición de la solución de Na₂S a 50 s y 4000 s se presentan en la Tabla 2.4.

Modo normal RR (cm ⁻¹)	MbFe ^{III} pH 7.4, 25°C	+ Na ₂ S (50s)	+ Na ₂ S (4000s)
	6cHS	6cLS	5cHS
v₄	1370	1372	1355
v₁₂	1388	1390	1390
v₂₈	1426	1429	1424
v₃	1481	1505	1473
v₃₈	1510	-	1521
v₂	1562	1562	1562
v₃₇	1582	1584	1585
v₁₀	1620	1619	1617

Tabla 2.4. Asignación de la señal RR de los espectros de MbFe^{III} 8x10⁻⁴ M y tras la adición de solución de Na₂S (R_{S/Fe} = 100), a pH 7.4, 25 °C, en condiciones anóxicas.

El espectro inicial muestra los picos característicos de la MbFe^{III} inicial, hexacoordinada de alto spin (6cHS). A los 50 segundos observamos la formación de un complejo hexacoordinado de bajo spin (6cLS) férrico, que corresponde al intermediario MbFe^{III}(HS⁻) previamente reportado.^{141,143} Es importante ver que el cambio de ligando involucra un cambio de espín del complejo intermediario. Este intermediario luego evoluciona a una forma ferrosa. A 4000 segundos de la adición de Na₂S, la posición de las bandas v₄, v₃, y v₁₀ cambia a 1355, 1473, y 1619 cm⁻¹ respectivamente, indicando la presencia de una especie de Fe^{II} pentacoordinada de alto spin (5cHS) como producto final,²⁹³ en contraste con las

observaciones del producto de reacción de la neuroglobina humana con sulfuro, donde las bandas ν_4 y ν_3 aparecen a 1362 cm^{-1} y 1482 cm^{-1} , lo que indica la presencia de un hemo ferroso de bajo espín.^{188,291,293}

Además, se realizaron experimentos de control en los que se añadieron soluciones de Na_2S o Na_2S_2 a MbFe^{II} , previamente obtenida por reducción con NaBH_4 de MbFe^{III} en condiciones anóxicas. El objetivo fue observar si se producen cambios en el espectro RR de MbFe^{II} con el agregado de estos ligandos que den cuenta de la unión de alguno de ellos (reacción 2.24). Ha sido reportado que la unión de ligandos como O_2 o CO provoca cambios significativos en el espectro RR tanto en mioglobina como hemoglobina.^{294,295} En el caso del O_2 , la gran diferencia en la frecuencia del modo ν_4 entre la hemoglobina oxigenada y desoxigenada se aprovecha para analizar el nivel de oxigenación en tejidos.²⁹⁶



Ninguno de los ligandos evaluados provocó cambios en el espectro RR de MbFe^{II} . En la región de bajas frecuencias, de $200 - 1700\text{ cm}^{-1}$ tampoco se evidenciaron cambios. Esto también indica que ningún ligando, además de la histidina proximal, se une a MbFe^{II} al final de la reacción (figura 2.30).

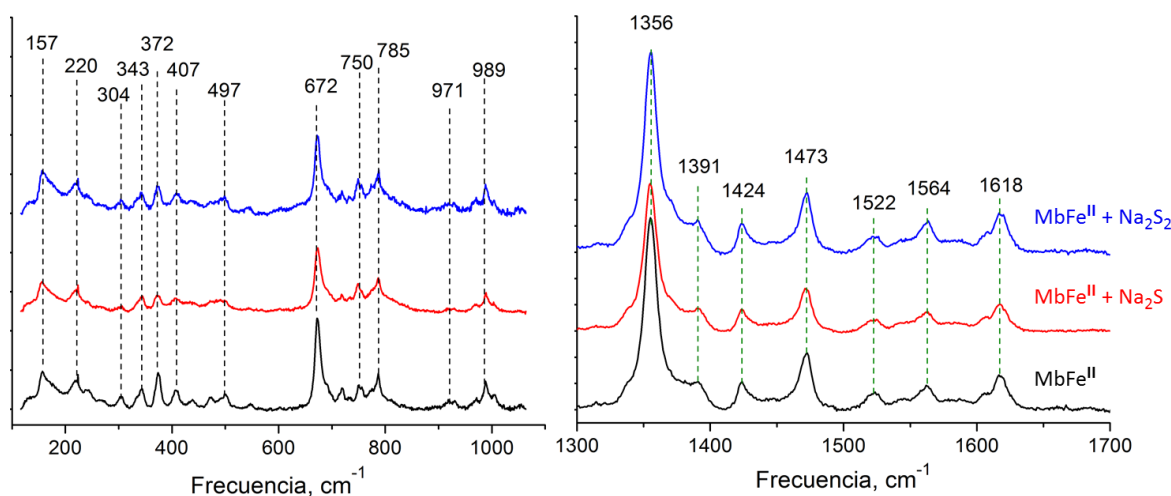


Figura 2.30. Espectro RR en la zona de frecuencias bajas (izquierda) y altas (derecha) de MbFe^{II} obtenida por reducción de MbFe^{III} con NaBH_4 (negro). Adición de H_2S (rojo) y HS^- (azul) a pH 7.4, 25°C , en condiciones anóxicas.

No se observan cambios espectroscópicos consistentes con hexacoordinación de la MbFe^{II} por agregado de exceso de HS^- ni HSS^- , en condiciones anóxicas. Tampoco se observan cambios en la zona entre 300 y 400 cm^{-1} , en la cual está reportada la aparición de bandas de absorción del estiramiento Fe-S.^{297,298} Concluimos entonces que MbFe^{II} no coordina HS^- ni HSS^- . Por lo tanto, nuestra propuesta mecanística no incluye la formación de especies HSS_n^- unidas a MbFe^{II} , como fue propuesto en experimentos en presencia de oxígeno.¹⁴¹

Destino del radical $\text{HS}^\bullet$

En cuanto al destino del radical, las evidencias experimentales y teóricas presentadas en las secciones 2.2.1, 2.2.3 y 2.2.5 sugieren que el mismo permanece en la matriz proteica, luego de la ruptura homolítica lenta (reacción 2.2).

Por un lado, se ha observado que el efecto del atrapante lipofílico PBN sobre la cinética fue significativo, aumentando drásticamente el tiempo de vida del complejo y su conversión a MbFe^{II} .

Por otra parte, los resultados del estudio de dinámica molecular de la residencia del radical $\text{HS}^\bullet$ en cavidades hidrofóbicas de la proteína sostienen la hipótesis de que el radical puede alojarse en al menos tres de las cuatro que se conocen por un intervalo de tiempo no despreciable (sección 2.2.5, figura 2.21).

$\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ como especie intermediaria del mecanismo

Los resultados de la reacción en presencia de agentes atrapantes hidrofílicos sugieren que el radical $\text{HS}^\bullet$ no sería liberado tal cual al medio. La reacción de dicho radical con un segundo equivalente de sulfuro sería plausible porque la concentración del sulfuro es relativamente elevada en nuestros experimentos. Si bien es un proceso reversible (reacción 1.23), la fracción de radical anión $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ no sería despreciable en medios ricos en sulfuro como en los experimentos realizados.^{50,129}

En acuerdo con lo propuesto, ha sido reportado que la reacción de formación de $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ es favorecida a mayor pH.¹²⁹ Los estudios cinéticos que realizamos a su vez indican que la velocidad de reducción de MbFe^{III} por sulfuro aumenta con el pH (sección 2.1.3, figura 2.10). Entonces, la formación de $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$, que involucra al anión HS^- ,

permite explicar la dependencia creciente con el pH de la constante cinética global $k_{\text{int},\text{SPL}}$ (sección 2.13, figura 2.11). Un factor razonable es la mayor nucleofilia de HS^- en comparación con H_2S para atacar al átomo de S del radical $\text{HS}^\bullet$. Por todo lo expuesto, proponemos que HS^- es la especie que reacciona con $\text{HS}^\bullet$ para formar reversiblemente $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$ como intermediario.

Por último, su residencia no sería favorable en un entorno hidrofóbico como los huecos de Xe a la luz de nuestras observaciones teóricas (sección 2.2.2) que sugieren que la estabilidad de las especies $\text{HSSH}^{\bullet-}$ y $\text{HSS}^{\bullet 2-}$ dependen de la red de puentes de hidrógeno que establece el agua a nivel de la primera esfera de solvatación. La estabilidad marginal que hemos mencionado también explica su reactividad respecto de la dismutación, para dar HSS^- como producto.

HSS^- es reductor y es la especie catalítica

La dismutación de $\text{HSSH}^{\bullet-}/\text{HSS}^{\bullet 2-}$, cuya formación está favorecida a pH alcalino, da como productos HSSH y HS^- . Por lo discutido en la sección 2.2.1 respecto de su acidez, HSSH se desprotona rápidamente y da lugar a HSS^- que es la especie mayoritaria en el rango de pH entre 6 y 8.^{34,249} El HSS^- resultó ser un reductor más rápido que el sulfuro para la MbFe^{III} (sección 2.2.6, figura 2.23). Esto puede explicarse en términos de su mayor nucleofilia y poder reductor.

Más aún, hemos observado un efecto sinérgico por agregado de HSS^- sobre el complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, en comparación con el agregado de HS^- o HSS^- por separado (sección 2.2.6, figura 2.24). En base a los estudios computacionales desarrollados en la sección 2.2.7 proponemos que la sinergia está relacionada con la trans-S-sulfuración del HSS^- libre sobre el HS^- coordinado, cuya barrera energética es aproximadamente 10 kcal/mol menor que para el intercambio directo de ligandos.

En resumen, proponemos a HSS^- como la especie responsable de la autocatálisis debido a que se genera como producto de la oxidación de sulfuro, y que no sólo es un reductor más potente, sino que tiene un efecto sinérgico que aceleraría la reducción de MbFe^{III} .

Estabilidad de HSS• y destinos finales de los átomos de S

El radical disulfanilo, HSS•/SS^{•-}, es producto de la oxidación del HSSH/HSS⁻ por MbFe^{III} (reacción 2.19), y es una especie con distintos destinos posibles.

HSS• dimeriza (reacción 2.25) y el producto resultante podría dar lugar a la formación de polisulfuros.^{95,195,299} De forma análoga, está propuesto que esta es la reacción preferida de decaimiento de radicales RSS•.³⁰⁰



Es necesario tener en cuenta que los experimentos han sido realizados en concentraciones de sulfuro en exceso respecto de MbFe^{III}, y que en atmósfera de argón el hierro hémico es el único oxidante disponible y limitante.

Si bien esperábamos que la presencia de polisulfuros se pusiera de manifiesto en la reacción de cianólisis fría, los resultados fueron negativos. Inclusive, los experimentos control de cianólisis de soluciones acuosas de Na₂S₂ revelaron que HSS⁻ no es cuantificable por esta técnica colorimétrica. En consecuencia, la cianólisis sólo nos permitiría detectar HSS_nH con n ≥ 2.

Algunos autores han propuesto que los polisulfuros formados podrían unirse inespecíficamente a la superficie proteica por medio de interacciones débiles, quedando inaccesibles para los reactivos de la cianólisis.^{141,200} No obstante, como hipótesis no es muy fuerte porque el CN⁻ podría tener acceso incluso al sitio activo de la mioglobina ya que se observa su interacción como ligando del centro metálico.³⁰¹

En base a lo reportado acerca de la termodinámica de las RSS inorgánicas, sobre todo sus aspectos cuantitativos,⁴⁷ es posible proponer algunas alternativas para el destino del sulfuro oxidado. En la sección 1.1.4 fue incluido un diagrama de Frost que permite formular hipótesis sobre el destino químico del sulfuro oxidado (figura 1.6). Por ejemplo, ha sido reportado que el radical anión SS^{•-}, que remeda al radical anión superóxido, O₂^{•-}, es más estable que su forma protonada HSS•, aunque su desproporción para dar HSS⁻ y S₂ es termodinámicamente accesible (reacción 2.26).



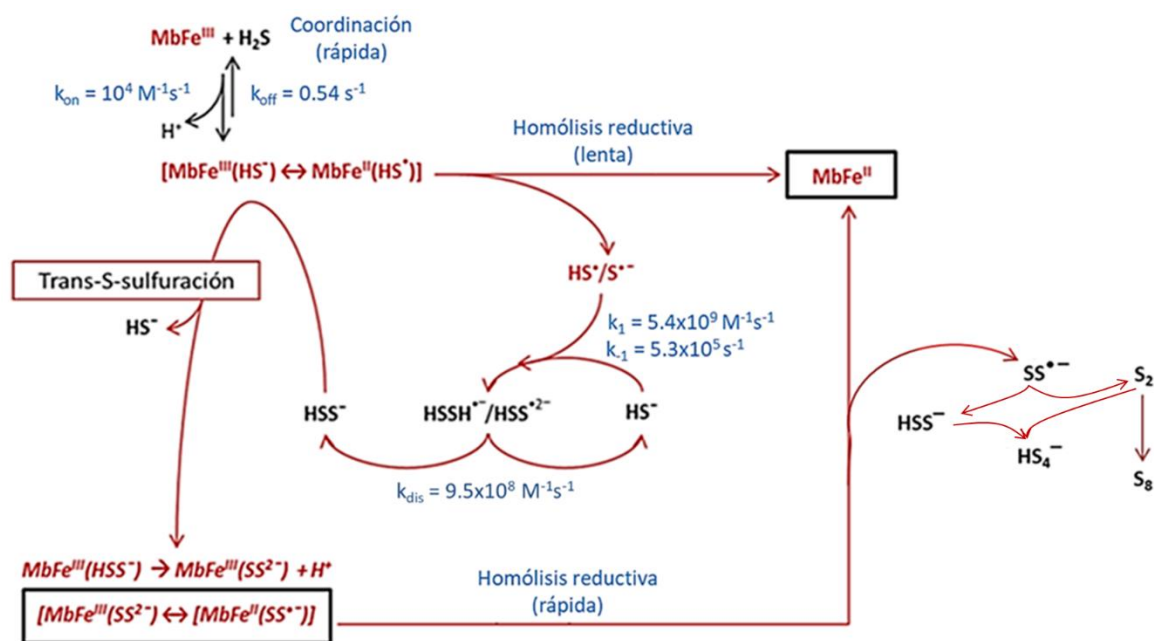
Más aún, S_2 en agua tiende a ciclarse o participar de reacciones con polisulfuros para terminar formando $\text{S}_8(\text{s})$, que se detecta fácilmente porque se agrega formando coloides. También puede comproporcionar con HS^- , formando HSS^- (reacción 2.27) o comproporcionar con HSS^- , formando tetrasulfuro, una especie relativamente estable dentro de la serie (reacción 2.28).⁴⁷



La formación de azufre elemental o de polisulfuros está favorecida a pH más ácidos, y es consistente con la observación de turbidez en los experimentos de pH cercano a 6 cuando la concentración de RSS es relativamente alta.

Propuesta mecanística de la reducción autocatalítica de MbFe^{III} mediada por H_2S

En base a todo lo expuesto anteriormente, proponemos el siguiente mecanismo de reacción (esquema 2.4).



Esquema 2.4. Propuesta mecanística para la reducción autocatalítica de MbFe^{III} mediada por H_2S en condiciones anóxicas

El mecanismo incluye la rápida unión de sulfuro a MbFe^{III} , con la subsiguiente homólisis reductiva. El paso de homólisis del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ es particularmente lento, dando como productos MbFe^{II} y $\text{HS}^\bullet$. Este último desencadena la formación de $\text{HSSH}^{\bullet-}$, el cual dismuta y genera HSS^- .

El HSS^- generado puede reaccionar con el complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ por trans-S-sulfuración, formando un complejo de disulfuro, $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$. Este nuevo complejo es capaz de dar la homólisis reductiva más rápido debido al mayor poder reductor del ligando, y da cuenta del aumento de la velocidad de formación de MbFe^{II} , por lo tanto, de la autocatálisis del proceso global.

Por último, los productos azufrados oxidados tienen tendencia a la concatenación, ya sea formando polisulfuros o azufre coloidal, siendo este último puesto en evidencia por la aparición de turbidez a tiempos largos.

2.3.2 Simulación del mecanismo de reacción de MbFe^{III} por sulfuro

Utilizando el software COPASI, el cual permite simular la cinética de sistemas de ecuaciones químicas, evaluamos la propuesta mecanística y estimamos aproximadamente algunas constantes cinéticas. El software construye ecuaciones diferenciales a partir de las ecuaciones químicas proporcionadas, y realiza la solución del sistema por métodos de integración numérica, útiles en el caso de sistemas no lineales respecto de los parámetros que se desean estimar, como en nuestro caso. Esto permite obtener curvas de concentración en función del tiempo de todas las especies químicas presentes en el mecanismo propuesto.

Obtuvimos perfiles cinéticos simulados para los reactivos, productos e intermediarios de reacción de la propuesta mecanística. En primer lugar, realizamos simulaciones con $[\text{H}_2\text{S}]_0$ variable a pH 7 y con pH variable, para $6.0 < \text{pH} < 8.0$. Utilizamos las constantes de velocidad reportadas disponibles. Para la formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ consideramos $k_{\text{on}} = 7 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{\text{off}} = 0.54 \text{ s}^{-1}$ (pH 7, 20 °C).¹⁸⁷ En cuanto a la dimerización $\text{HS}^\bullet$, reacción 1.31, no la consideramos en la simulación del mecanismo debido a que su inclusión en el modelo no cambia el resultado de los cursos temporales obtenidos. Para la reacción de formación del

radical anión $\text{HSSH}^{\bullet-}$ utilizamos $k_{\text{on}} = 4.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{\text{off}} = 5.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (a pH 7 y 7.5, respectivamente).⁵⁰ Para la dismutación de $\text{HSSH}^{\bullet-}$ utilizamos una constante de velocidad reportada $k_{\text{dis}} = 9.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹²⁹ Para la desprotonación de H_2S , estimamos valores para las constantes cinéticas del equilibrio ácido-base que recuperaron la constante de equilibrio reportada, $K_{\text{a1}} = 1.05 \times 10^{-7}$.^{17,22,23}

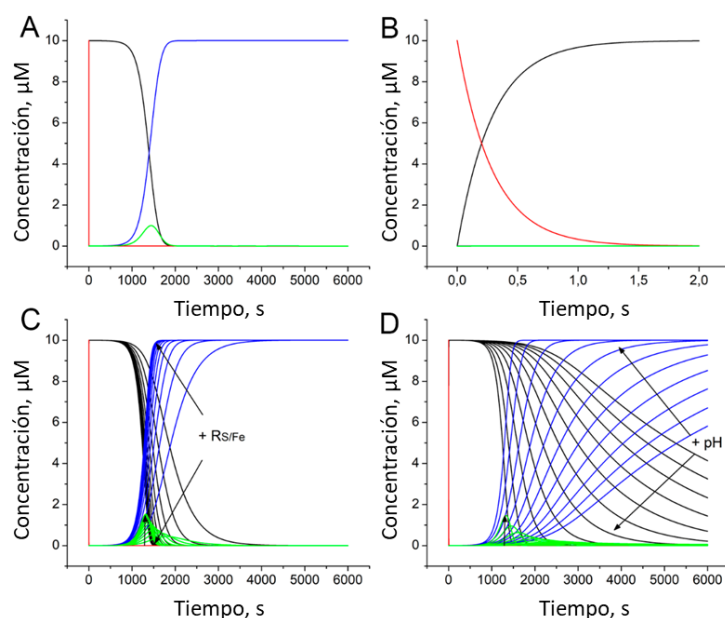


Figura 2.31 Simulación de la reacción de MbFe^{III} con Na_2S . A) Trazas completas (6000 s), pH=7, $R_{\text{S/Fe}}=100$, B) Trazas iniciales (2 s), pH=7, $R_{\text{S/Fe}}=100$ C) pH fijo (pH=7), $R_{\text{S/Fe}}$ variable ($50 < R_{\text{S/Fe}} < 200$). D) $R_{\text{S/Fe}}$ fijo ($R_{\text{S/Fe}}=100$), pH variable ($6 < \text{pH} < 8$). MbFe^{III} , trazas rojas; $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, trazas negras; MbFe^{II} , trazas azules; $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-)$, trazas verdes.

En la figura 2.31, los paneles A y B representan el comportamiento simulado de trazas cinéticas seleccionadas del proceso en estudio considerando $R_{\text{S/Fe}} = 100$ y pH = 7. La figura 2.31, panel A, revela la rápida formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ (traza negra) a partir de sulfuro y MbFe^{III} (traza roja) y la formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-)$ (trazas verdes) como intermedio del proceso global, con la formación de MbFe^{II} (trazas azules). Los primeros 2 segundos del proceso se muestran en el panel B y representan la formación exponencial de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.

En el panel C, el aumento de la velocidad de formación de MbFe^{II} se reproduce con un aumento de $R_{\text{S/Fe}}$, de acuerdo con los resultados experimentales (figura 2.8). En el panel D,

los parámetros seleccionados permitieron simular un aumento de la velocidad de formación de MbFe^{II} con un aumento del pH, también de acuerdo con los resultados experimentales (figura 2.10).

Los productos azufrados finales difícilmente se puedan estudiar experimentalmente de forma aislada con las herramientas disponibles a la fecha.⁹⁵ De no existir reacciones de terminación de especies como HSS^{*} en el modelo, las curvas obtenidas son simétricas, y no representan con la misma fidelidad las observaciones experimentales. En estas simulaciones COPASI, se incluyó en el modelo al menos una reacción de terminación para explicar la asimetría del comportamiento sigmoideo del proceso, tal como se observó experimentalmente (figura 2.5). Propusimos dichas reacciones teóricamente a partir de parámetros termodinámicos reportados.^{47,48} El conjunto completo de reacciones, especies y parámetros derivados se incluye en la Tabla 2.5.

Reacción	Parámetros cinéticos	Referencias
$\text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{HS}^- + \text{H}^+$	$k_a = 6.88 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ $k_b = 7.11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Calculado; $K_{a1} = 1.05 \times 10^{-7}$
$\text{MbFe}^{\text{III}} + \text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$	$k_{\text{on}} = 7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{\text{off}} = 0.54 \text{ s}^{-1}$	Boubeta (2018) ¹⁴³ Jensen (2018) ¹⁷⁴ Mot (2018) ¹⁸⁷
$\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-) \rightarrow \text{MbFe}^{\text{II}} + \text{HS}^*$	$k_{\text{slowred}} = 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	Estimado
$\text{HS}^- + \text{HS}^* \rightleftharpoons \text{HSSH}^{*-}$	$k_{\text{formación}} = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{\text{descomposición}} = 5.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	Mills (1987) ¹²⁹
$2 \text{HSSH}^{*-} \rightarrow \text{HSS}^- + \text{H}_2\text{S}$	$k_{\text{desproporción}} = 9.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Mills (1987) ¹²⁹
$\text{HSS}^- + \text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-) \rightarrow \text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-) + \text{HS}^-$	$k_{\text{sustitución}} = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Estimado
$\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-) \rightleftharpoons \text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-}) + \text{H}^+$	$k_{a2} = 1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ $k_{a-2} = 5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Estimado
$\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-) \rightarrow \text{MbFe}^{\text{II}} + \text{HSS}^*$	$k_{\text{fastredHSS}} = 4.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Estimado
$\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-}) \rightarrow \text{MbFe}^{\text{II}} + \text{SS}^{*-}$	$k_{\text{fastredSS}} = 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	Estimado
$2 \text{SS}^{*-} \rightarrow \text{S}_2 + \text{S}_2^{2-}$	$k_{\text{despropSS}} = 1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Estimado
$\text{S}_2 + 2 \text{HS}^- \rightarrow 2 \text{HSS}^-$	$k_{\text{comproporción}} = 4.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Estimado
$\text{HSS}^- + \text{S}_2 \rightarrow \text{S}_4^{2-} + \text{H}^+$	$k_{\text{polisulfuro}} = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Estimado

Tabla 2.5. Reacciones del modelo utilizado para las simulaciones COPASI y parámetros cinéticos derivados.

Como perspectiva, sería necesario el estudio sistemático experimental de identidad de las RSS inorgánicas que aparecen como productos finales explorando otras herramientas analíticas disponibles, aunque a la fecha la química analítica de polisulfuros presenta limitaciones.^{114,150} También es necesario aclarar que el uso de esta metodología sirve a los fines cualitativos de evaluación de la consistencia de un sistema de ecuaciones respecto de las variables experimentales, es decir, si el mecanismo propuesto es capaz de reproducir la forma de las trazas cinéticas y las variaciones que se producen al modificar concentraciones iniciales y pH.

2.4 Conclusiones

Hemos realizado un estudio cinético y mecanístico de la reducción de metmioglobina por sulfuro inorgánico en atmósfera de argón. Encontramos que, en presencia de exceso de sulfuro, la rápida formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ es seguida por un lento proceso de reducción que sigue una traza sigmoidea, que caracteriza los mecanismos de reacción autocatalíticos. Se verificó una respuesta dosis-tiempo completa.

La tasa de reducción global aumentó con la concentración total de sulfuro y el pH. Se estimó un valor de $k_{\text{obs}} = 9.1 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el crecimiento exponencial en la fase inicial lenta de la reducción, que precede a la fase autocatalítica del proceso. Se observó que la concentración del anión HS^- desempeñaba un papel crítico en el pronunciado aumento de la tasa de reducción.

Sugerimos que la descomposición homolítica del complejo $[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-) \leftrightarrow \text{MbFe}^{\text{II}}(\text{SH}^\bullet)]$ forma pequeñas cantidades iniciales del producto ferroso y cantidades estequiométricas del radical sulfanilo. De acuerdo con los resultados obtenidos con reactivos atrapantes de radicales, sugerimos que el radical sulfanilo permanece reversiblemente dentro de la matriz proteica.

Se propone que el anión HS^- y el radical sulfanilo forman el radical disulfanuidilo, $\text{HSSH}^{\bullet-}$, que puede dismutar en HS^- y HSS^- ,^{50,129} que es la especie propuesta como responsable de la autocatálisis. Los resultados de la adición sucesiva de HS^- y HSS^- sobre la cinética de

reducción de MbFe^{III} sugieren un efecto sinérgico, evaluado computacionalmente como un proceso de trans-S-sulfuración.

Las simulaciones determinísticas del mecanismo propuesto realizadas en COPASI permitieron verificar la plausibilidad de la propuesta. Los resultados pueden resultar útiles para la interpretación de aspectos bioquímicos de especies de sulfuro y las mioglobinas en condiciones de hipoxia.

2.5 Materiales y métodos

2.5.1 Experimentales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza disponible, y fueron comprados a Sigma-Aldrich/Merck, salvo que se indique lo contrario. Las soluciones reguladoras fueron preparadas a partir de agua desionizada ($C \leq 2\mu S$) conteniendo ácido dietilen-triamin-pentaacético (DTPA, por su sigla en inglés) como quelante. En todos los casos se utilizó metmioglobina de corazón equino. Las soluciones de sulfuro utilizadas fueron preparadas en el momento de su uso a partir de Na₂S anhidro (>98%, titulado por iodometría), almacenado dentro de una caja de guantes (<1 ppm O₂; <1 ppm H₂O). DMPO se compró a Alfa Aesar. El DMPO y PBN se almacenaron dentro de la caja de guantes. PBN se disolvió en etanol (1 M) y se conservó a -18 °C hasta su utilización. El dicloruro de MV²⁺ se disolvió en agua pura antes de su uso. El disulfuro disódico, Na₂S₂, se preparó a partir de Na₂S y azufre siguiendo los procedimientos descritos.¹³⁷

Preparación de soluciones reguladoras

Para la preparación de soluciones de fosfato de sodio (NaPi) de pH entre 5.3 y 8.0, se utilizó fosfato monobásico de sodio, NaH₂PO₄, y fosfato dibásico de sodio, Na₂HPO₄, ambos comerciales anhidros. Se prepararon soluciones madre 0.2 M de ambos fosfatos y se agregó DTPA como quelante, con una concentración final de 0.2 mM en cada solución madre. Las soluciones reguladoras por utilizar en los experimentos se prepararon por mezcla de las soluciones madre de NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄, con la dilución correspondiente.

Soluciones de sulfuro, disulfuro y metmioglobina

El agua desionizada y las soluciones reguladoras fueron purgadas burbujeando con argón durante 20 minutos. Las soluciones reguladas con MbFe^{III} se purgaron exhaustivamente con argón en el recipiente utilizado para espectroscopía. Las soluciones madre de Na₂S o Na₂S₂ se prepararon añadiendo agua saturada de argón al material sólido purgado con argón, en recipientes con septa de silicona. Las concentraciones de las soluciones de MbFe^{III} se determinaron utilizando el coeficiente de absorptividad molar reportado, $1.88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 409 nm, y fueron aproximadamente 10^{-5} M .¹⁴¹ Además, las concentraciones de las soluciones de sulfuro diluidas se determinaron utilizando un coeficiente de absorptividad de $7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 230 nm.¹⁴⁵ La manipulación de las soluciones se realizó utilizando jeringas herméticas (*gas-tight*) Supelco o Hamilton.

Reacción de MbFe^{III} con Na₂S en condiciones anóxicas

Se realizaron experimentos a pH 7.4 con relaciones de concentración molar variables mezclando MbFe^{III} (10^{-5} M) con alícuotas de solución de Na₂S (aprox. $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$) para obtener $R_{S/Fe}$ de 5 a 400, a 25 °C bajo atmósfera de argón. La cinética de la reacción se registró mediante espectroscopia UV-vis, utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP 8453, con lámparas independientes de deuterio y tungsteno. Se utilizaron cubetas de cuarzo con tapones de rosca y septa de silicona. Las cubetas se colocaron en una cámara anóxica, con un flujo constante de argón para garantizar la ausencia de oxígeno. En esta etapa, antes de añadir la solución de sulfuro, la fuente de argón se desoxigenó burbujeándola en una trampa que contenía una solución de CrCl₂ 0,2 M en H₂SO₄ 0,05 M y Zn(Hg). Para el análisis se recogieron trazas temporales a 434 nm. El tiempo total de observación para cada medición varió de 40 min a 2 h.

Los experimentos con $R_{S/Fe}$ variable se realizaron de forma similar a diferentes valores de pH entre 5.3 y 8.0. Los experimentos en los que se observó la formación de sulfmioglobina ($\lambda = 617 \text{ nm}$) se excluyeron del análisis, ya que modificaban la cinética y probablemente denotaban una filtración de oxígeno no deseada.

Reacción de MbFe^{III} y cyt c-Fe^{III} con Na₂S en presencia de DMPO, PBN o MV²⁺

Se realizaron experimentos cinéticos análogos a los del apartado anterior ($\text{pH} = 7.4$, $T = 25^\circ\text{C}$, atmósfera de argón), en presencia o ausencia de DMPO, PBN o MV^{2+} . Las soluciones madre de DMPO y MV^{2+} fueron preparadas en agua. La solución madre de PBN fue preparada en etanol. En cada caso se agregaron 100-300 equivalentes de DMPO o PBN, o bien 10-100 equivalentes de MV^{2+} , previo al agregado de solución de Na_2S . También fue realizado un control para el caso del PBN agregando el volumen correspondiente de etanol en ausencia de PBN. Además, se realizaron experimentos análogos usando $\text{cyt c-Fe}^{\text{III}}$ (10^{-5} M) en condiciones anóxicas.

Caracterización de Na_2S_2 por ^1H y ^{13}C RMN de derivados bencílicos

El material sólido de Na_2S_2 fue disuelto en dimetoxietano (DME) previamente purgado dentro de material de Schlenk, en condiciones anóxicas. Luego fue derivatizado por agregado lento de cloruro de bencilo (BzCl) bajo agitación constante, con control del avance de la reacción por cromatografía en capa delgada (CCD) revelando bajo lámpara UV (254 nm). Al completarse la reacción, el producto fue extraído con CH_2Cl_2 , secado y redisoluto en CDCl_3 . La identificación de los derivados Bz_2S_n se realizó por medio de ^1H y ^{13}C RMN, en base a las señales reportadas para $n \leq 4$.^{95,157} La cuantificación para determinar la composición relativa de la muestra fue realizada en base al área relativa de los picos en el ^1H RMN.

Reacción de MbFe^{III} y $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ con Na_2S_2

Se realizaron experimentos cinéticos análogos a los de reacción de MbFe^{III} con solución de Na_2S , mezclando MbFe^{III} ($8 \times 10^{-6} \text{ M}$) con alícuotas de solución madre de Na_2S_2 ($2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$), obteniendo $R_{\text{SS/Fe}}$ de 10 a 50, a $\text{pH} 7.4$, 25°C . El tiempo total de observación para cada medición varió de 2 a 25 min, y el registro de datos se realizó cada 0.5 s. La adición de solución de Na_2S_2 a $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$ se realizó de forma similar, obteniendo este último por agregado de Na_2S ($R_{\text{S/Fe}}=100$) inmediatamente antes del agregado de solución de Na_2S_2 .

Espectroscopía de Raman resonante

Los espectros de Raman resonante (RR) se registraron utilizando un microscopio confocal Raman (Horiba LabRam HR Evolution), equipado con detección CCD y una rejilla de 1800 L/mm. Los incrementos por punto de datos fueron de 0.4 cm^{-1} y los tiempos de integración

fueron de 10 a 50 s. Se utilizó excitación de banda Soret (406 nm; láser de diodo TopModeHP-406 Toptica Photonics AG, Munich; 3,5 mW en la muestra). La calibración espectral se realizó utilizando patrones químicos.

Los experimentos RR se realizaron mezclando soluciones de MbFe^{III} (8×10^{-4} M) con Na_2S ($R_{\text{S/Fe}} = 100$) o Na_2S_2 ($R_{\text{SS/Fe}} = 40$) utilizando jeringas *gas-tight* en cubetas de cuarzo de 3 mL, provistas de tapones de rosca con septa de silicona. Las condiciones anóxicas se mantuvieron por ingreso constante de N_2 . Se mantuvo la agitación magnética durante toda la medición espectroscópica para evitar la degradación inducida por el láser. También se realizaron experimentos de control sobre MbFe^{II} obtenida tras la adición de NaBH_4 a MbFe^{III} a pH 7.4, y posterior agregado de exceso de Na_2S o Na_2S_2 .

Cianólisis en frío

La cianólisis en frío se realizó según los procedimientos reportados,^{141,149,184} sobre la reacción de MbFe^{III} (10^{-4} M) con solución de Na_2S ($R_{\text{S/Fe}}=100$) a pH 7.4, $T=25^\circ\text{C}$, bajo atmósfera de argón, luego de observar la formación máxima del producto ($A_{434\text{nm}}$) por espectroscopía UV-vis. Una alícuota de 0.5 mL de la mezcla de reacción se mezcló con 0.25 mL de una solución de KCN 62.5 mM y NH_4OH 125 mM, y se incubó durante 45 min a 25°C . Tras la incubación, se añadió el reactivo Goldstein (0.75 mL),¹⁴⁹ se centrifugó la suspensión y se midió el sobrenadante claro a 460 nm. Todas las soluciones se manipularon con jeringas *gas-tight* y se mantuvieron bajo atmósfera de argón antes de añadir el reactivo Goldstein. Para la curva de calibración, se prepararon soluciones de KSCN de 20 μM a 500 μM y se trataron con el reactivo de Goldstein, registrándose la absorbancia a 460 nm.

Reducción de HSS^- con TCEP y ensayo de método del azul de metileno

Se realizó la detección de sulfuros oxidados por reducción con TCEP y la cuantificación de sulfuro con el método del azul de metileno. Se incubó anóxicamente una solución de MbFe^{III} (3×10^{-5} M) con solución de Na_2S (concentración final 1.5×10^{-4} M, $R_{\text{S/Fe}} = 5$) a pH 7.4, 25°C . La conversión completa a MbFe^{II} ocurre luego de 5000 s, y 600 s más tarde se incuban anóxicamente dos alícuotas de 1.5 mL del medio de reacción con 50 μL de una solución de TCEP 0.04 M o un volumen igual de solución reguladora, en cubetas de cuarzo separadas de

1 cm de longitud de paso óptico, provistas de tapones de rosca y septa de silicona. Después de 1 min, a cada alícuota se agregaron 5 μL de DMPD 0.85 M y 0.16 mL de FeCl_3 9 M. Después de 5 min, se registró la absorbancia a 668 nm. Se realizaron experimentos en ausencia de MbFe^{III} y en ausencia de sulfuro como controles de absorbancia basal y máxima a 668 nm, respectivamente.

2.5.2 Computacionales

Cálculos de optimización y energía libre

Para la optimización de geometría molecular de nitronas, RSS y complejos de porfirinas modelo se realizaron cálculos electrónicos en solvente implícito mediante el modelo de solvente continuo polarizable (PCM, *polarizable continuum model*) con parámetros por defecto o modificando la constante dieléctrica ($\epsilon = 8$) para simular entornos hidrofóbicos.

Los métodos empleados fueron la teoría del funcional de la densidad (DFT) utilizando los funcionales B3LYP, M06-2X y ωB97xD , así como MP2, y *coupled cluster* con excitaciones simples y dobles (CCSD). Como conjuntos de bases se emplearon 6-31G*, 6-31G** y 6-311++G(2df, 2p). Los cálculos de optimización fueron realizados en Gaussian09 para la evaluación de acidez de RSS (sección 2.2.1), estabilidad de disulfanuidilo (sección 2.2.2) y factibilidad de captura de radicales por nitronas (sección 2.2.4). En cambio, los cálculos de optimización fueron realizados en Orca para la evaluación de la hipótesis de trans-S-sulfuración (sección 2.2.7) por compatibilidad con la rutina de NEB utilizada luego.

Evaluación de intercambio de ligandos y trans-S-sulfuración por el método de la banda elástica (NEB)

Los cálculos de banda elástica fueron realizados tomando las estructuras previamente optimizadas de los reactivos y productos acorde al esquema 2.3 (sección 2.2.7). El nivel de teoría empleado fue PBE0/6-31G**. Se estableció un número total de 50 imágenes a lo largo de la banda inicial, con un máximo de 500 iteraciones por imagen por paso, y un máximo de 100 iteraciones de optimización de la banda.

Para las estructuras de reactivos y productos se utilizaron modelos minimalistas que consistieron en porfirinatos férricos sin sustituyentes en los anillos ni en las posiciones meso, N-metil-imidazol como ligando proximal, y las especies HS^- y HSS^- . No se incluyeron moléculas de H_2O explícitas. El estado de espín total del sistema era de bajo espín ($S=2$).

3. La reducción de MbFe^{III} mediada por disulfuro en condiciones anóxicas.

En el Capítulo 2 propusimos al hidrodisulfuro, HSS⁻, como intermediario responsable de la autocatálisis observada en la reacción entre MbFe^{III} y sulfuro. Presentamos una diferencia de reactividad frente a la reacción de reducción centrada en el metal de MbFe^{III} mediada por sulfuro (sección 2.2.6, figura 2.23). La traza temporal de formación de MbFe^{II} es más rápida y no tiene forma sigmoidea como en el caso del sulfuro, sino exponencial.

Considerando a la MbFe^{III} como hemoproteína representativa, nos propusimos estudiar la reacción de MbFe^{III} con HSS⁻ con el objetivo de conocer sus aspectos cinéticos, espectroscópicos y mecanísticos. Como fuente de HSS⁻ utilizamos Na₂S₂, de forma similar al utilizado en los experimentos de la sección 2.2.6.

Complejo intermediario y producto final: Caracterización espectroscópica por UV-Vis y RR

Realizamos experimentos cinéticos de reducción de MbFe^{III} por agregado de Na₂S₂ (R_{SS/Fe}=40) a pH = 7.4 y T = 25 °C, bajo atmósfera de argón. Los detalles experimentales se encuentran en la sección 3.6. Los cambios observados por espectroscopía UV-Visible convencional se muestran en la figura 3.1.

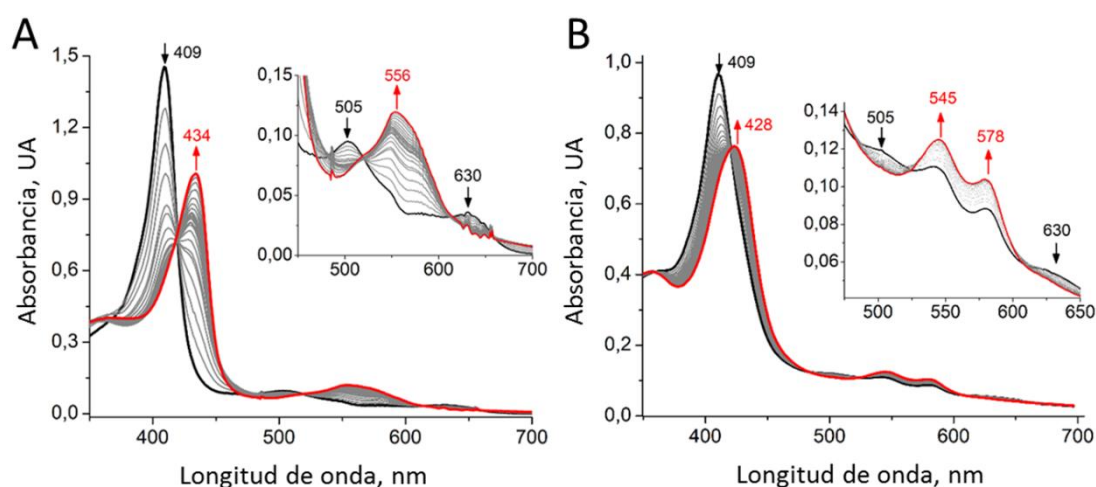


Figura 3.1. Cambios espectroscópicos de MbFe^{III} (línea negra) por agregado de HSS⁻, R_{SS/Fe}=40 (400 μM), pH=7.4, 25°C bajo atmósfera de argón (espectros intermedios en líneas grises y espectro final en línea roja). A) Espectroscopía convencional, tiempo total 30 min; B) Flujo detenido, tiempo total 3 segundos.

La reacción entre MbFe^{III} y HSS^- en las condiciones mencionadas da como producto final una especie que presenta la banda de Soret centrada en 434 nm y una banda Q centrada en 556 nm (figura 3.1, panel A), consistente con la reducción a MbFe^{II} . La ausencia de puntos isobésticos claros y la aparición de otras bandas Q en espectros intermedios de la cinética, que no pertenecen a los reactivos de partida ni a los productos, sugieren la presencia de un complejo intermediario. La posición aproximada de las bandas Q del intermediario se asemeja a las bandas observadas en el espectro del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$.

Para registrar el espectro del intermediario, realizamos experimentos análogos mediante la técnica de flujo detenido, que optimiza el mezclado de las soluciones y permite una resolución temporal del orden de los milisegundos. En la figura 3.1, panel B, se observa la conversión de MbFe^{III} de partida en un intermediario de reacción con una banda de Soret centrada en 428 nm y bandas Q en 545 y 578 nm que se produce en la fase inicial del proceso de reducción. El corrimiento de la banda de Soret de 409 nm a 428 nm presenta un punto isobéstico ubicado en 420 nm, que sugiere la conversión en un paso. El intermediario tiene las características espectroscópicas de un complejo hexacoordinado de bajo espín, y se asemeja espectroscópicamente al complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SH}^-)$, caracterizado previamente.^{141,143,174} Luego de la formación de este intermediario, la reacción evoluciona hasta la formación final del producto con máximos a 434 y 556 nm, de forma similar a lo observado en el experimento de espectroscopía convencional.

Para completar la caracterización del intermediario y el producto, realizamos la reacción de MbFe^{III} y disulfuro con una relación molar $R_{\text{SS/Fe}} = 20$ y a menor temperatura (9°C), registrando los cambios espectroscópicos por UV-Vis y RR. En la figura 3.2 se pueden observar los espectros obtenidos. Los resultados se reunieron en la tabla 3.1.

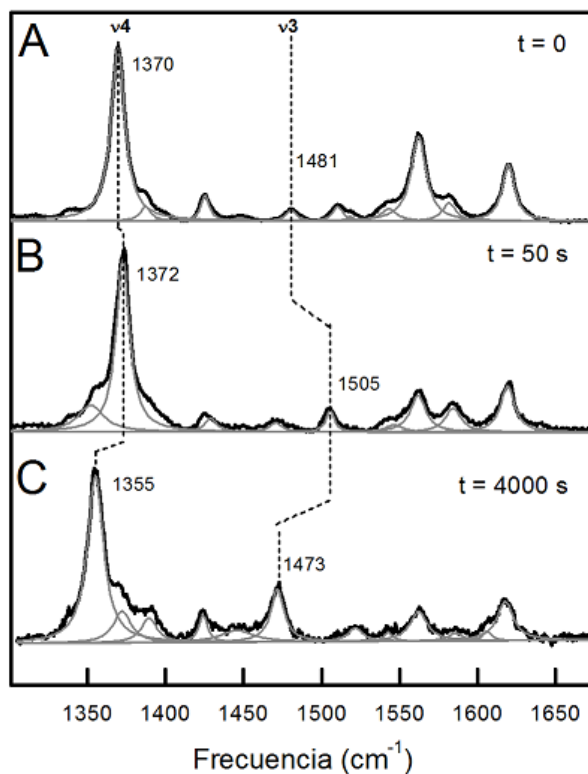


Figura 3.2. Espectros RR de MbFe^{III} 10⁻⁴ M, pH 7.4, 9 °C (línea negra). A) MbFe^{III}; B) 50 segundos luego del agregado de Na₂S₂, R_{SS/Fe} = 40; C) 4000 segundos luego del agregado de Na₂S₂.

	MbFe ^{III} pH 7.4, 9°C	+ Na ₂ S ₂ (50s)	+ Na ₂ S ₂ (4000s)
Modo normal RR (cm ⁻¹)	6cHS	6cLS	5cHS
V₄	1370	1372	1355
V₁₂	1388	1390	1390
V₂₈	1426	1429	1424
V₃	1481	1505	1473
V₃₈	1510	-	1521
V₂	1562	1562	1562
V₃₇	1582	1584	1585
V₁₀	1620	1619	1617

Tabla 3.1. Asignación de la señal RR de los espectros de MbFe^{III} 8×10⁻⁴ M y tras la adición de solución de Na₂S₂ (R_{SS/Fe} = 40), a pH 7.4, 9°C, en condiciones anóxicas.

El espectro inicial de MbFe^{III} presenta las bandas ν_4 (1370 cm⁻¹), ν_3 (1481 cm⁻¹), ν_2 (1562 cm⁻¹), y ν_{10} (1620 cm⁻¹) que corresponden a un hemo Fe^{III} de alto espín. Junto con estas señales, también se observan bandas en 1426, 1510 y 1582 cm⁻¹, todas consistentes con datos reportados para MbFe^{III} de corazón equino en condiciones experimentales similares.³⁰²

Tras la adición de HSS⁻, las bandas ν_4 , ν_3 y ν_{10} se desplazaron a 1372, 1505, y 1619 cm⁻¹ respectivamente, mientras que la banda ν_2 permaneció con la misma frecuencia. Estos cambios de señales sugieren la presencia de una especie férrica hexacoordinada de bajo espín (6cLS) consistente con la unión de un ligando de campo alto, que proponemos que es HSS⁻. El cambio observado resultó similar al reportado previamente para la coordinación de sulfuro sobre MbFe^{III} a los 50 s de reacción (sección 2.3.1, figura 2.29) y también es consistente con registros hechos para hemoglobina I de *Lucina pectinata*, hemoglobinas truncadas de *Bacillus subtilis* (Bs-trHb) y *Thermobifida fusca* (Tf-trHb), y compuestos modelo de hemo.^{140,141,176,298,303}

Proponemos que el intermediario observado es MbFe^{III}(HSS⁻). También consideramos que el complejo MbFe^{III}(SS²⁻) puede estar en equilibrio, ya que para el HSSH libre el pK_{a2} = 10,⁹² y la naturaleza aceptora de electrones del hierro férrico puede reducir el pK_{a2} en varias unidades.^{181,304,305}

La región de baja frecuencia del espectro RR de este intermediario 6cLS no muestra cambios significativos con respecto al estado inicial de MbFe^{III} entre 200 y 700 cm⁻¹, donde podría esperarse la banda de estiramiento fuera del plano Fe-S entre 373-375 cm⁻¹, según un estudio realizado para distintas hemoglobinas truncadas.²⁹⁸ Ha sido reportado que esta banda de estiramiento Fe-S puede resultar de baja intensidad para ser detectada.

Sin embargo, la región entre 700 y 1050 cm⁻¹ muestra diferencias en las intensidades relativas de las bandas y la aparición de una banda a 792 cm⁻¹ (figura 3.3). El origen de esta banda no está claro ya que esta región no suele ser reportada para la reacción del sulfuro con otras hemoproteínas.

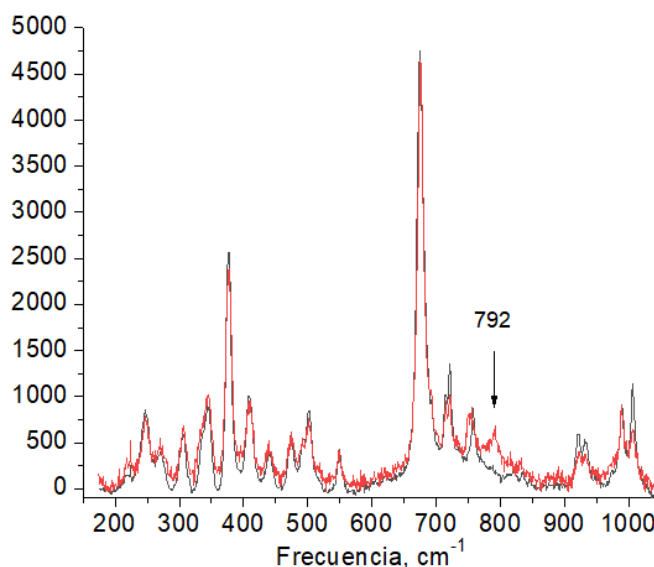


Figura 3.3. Espectro RR de bajas frecuencias de MbFe^{III} (negro) y el complejo intermediario (rojo).

Cuando la reacción avanza hasta sus productos finales, se observa en la zona de altas frecuencias que las bandas ν_4 , ν_3 y ν_{10} se corren a 1355, 1473 y 1617 cm⁻¹ respectivamente (figura 3.2, panel C), indicando la formación de una especie ferrosa y pentacoordinada de alto spin (5cHS). El espectro final es consistente con los obtenidos previamente por reducción de MbFe^{III} por ditionito sódico, Na₂S₂O₄,³⁰⁶ y NaBH₄.

Esto contrasta con el caso de la neuroglobina humana (h-Ngb), en la que al realizar un procedimiento similar se reportaron bandas en 1362 y 1482 cm⁻¹, que indican la presencia de una especie ferrosa, de bajo spin (6cLS), en la que el sexto ligando es una histidina de la cavidad distal.¹⁸⁸

Las observaciones espectroscópicas de ambas técnicas son consistentes. Dado que tanto el espectro UV-Vis como el RR de MbFe^{II} coincidían con el producto final de la reacción de MbFe^{III} y HSS⁻, concluimos que no se observaba la formación de productos ferrosos hexacoordinados, de tipo MbFe^{II}(HSS_n⁻), en las condiciones de reacción descritas. Estas observaciones son congruentes con los resultados presentados en el Capítulo anterior, sección 2.2.8, respecto del agregado de H₂S o de HSS⁻ en exceso sobre MbFe^{II} (Fig. 2.30).

3.1 Coordinación de HSS^- a MbFe^{III}

Estudiamos la cinética de formación del complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)/\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})$ por medio de técnicas de flujo detenido, en atmósfera inerte.

3.1.1 Determinación de la constante de unión, k_{on} , por flujo detenido

El mezclado rápido de soluciones de MbFe^{III} y Na_2S_2 fue estudiado para una concentración analítica $[\text{MbFe}^{\text{III}}]_0 = 10 \mu\text{M}$ al inicio de la reacción, variando la relación molar $R_{\text{SS}/\text{Fe}}$ de 10 a 100. El decaimiento de la absorción a 409 nm (MbFe^{III}) en función de $R_{\text{SS}/\text{Fe}}$ se observa en la figura 3.4. Los ajustes monoexponenciales se encuentran en la figura 3.5.

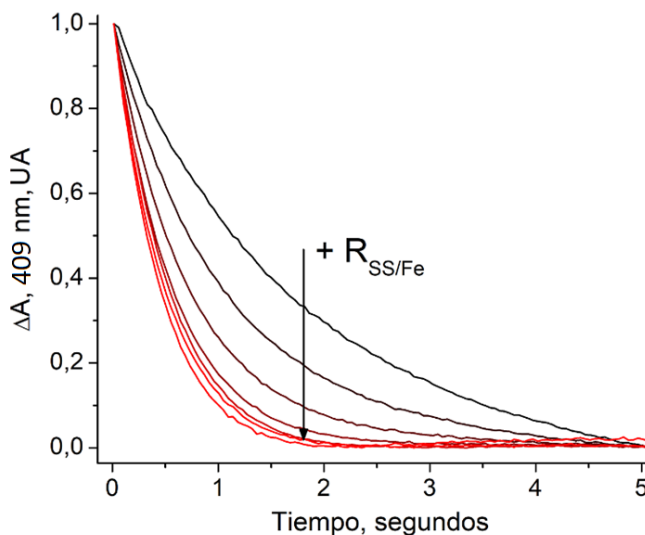


Figura 3.4. Trazas temporales a 409 nm para MbFe^{III} $10 \mu\text{M}$, tras la adición de solución de Na_2S_2 ($R_{\text{SS}/\text{Fe}} = 10, 20, 40, 60, 75, 80$ y 100 en líneas sucesivas de negro a rojo) mediante mezcla rápida en condiciones de flujo detenido, a pH 7.4, 25°C , bajo atmósfera de argón.

Los datos experimentales se ajustaron razonablemente a una función de decaimiento monoexponencial. El ajuste funcional resultó de buena calidad a todas las relaciones molares $R_{\text{SS}/\text{Fe}}$ estudiadas. El uso de concentraciones más altas de HSS^- presentó dificultades en el procesamiento de los espectros por distorsiones, debidas a la formación rápida de S_8 coloidal, que provoca dispersión de luz.

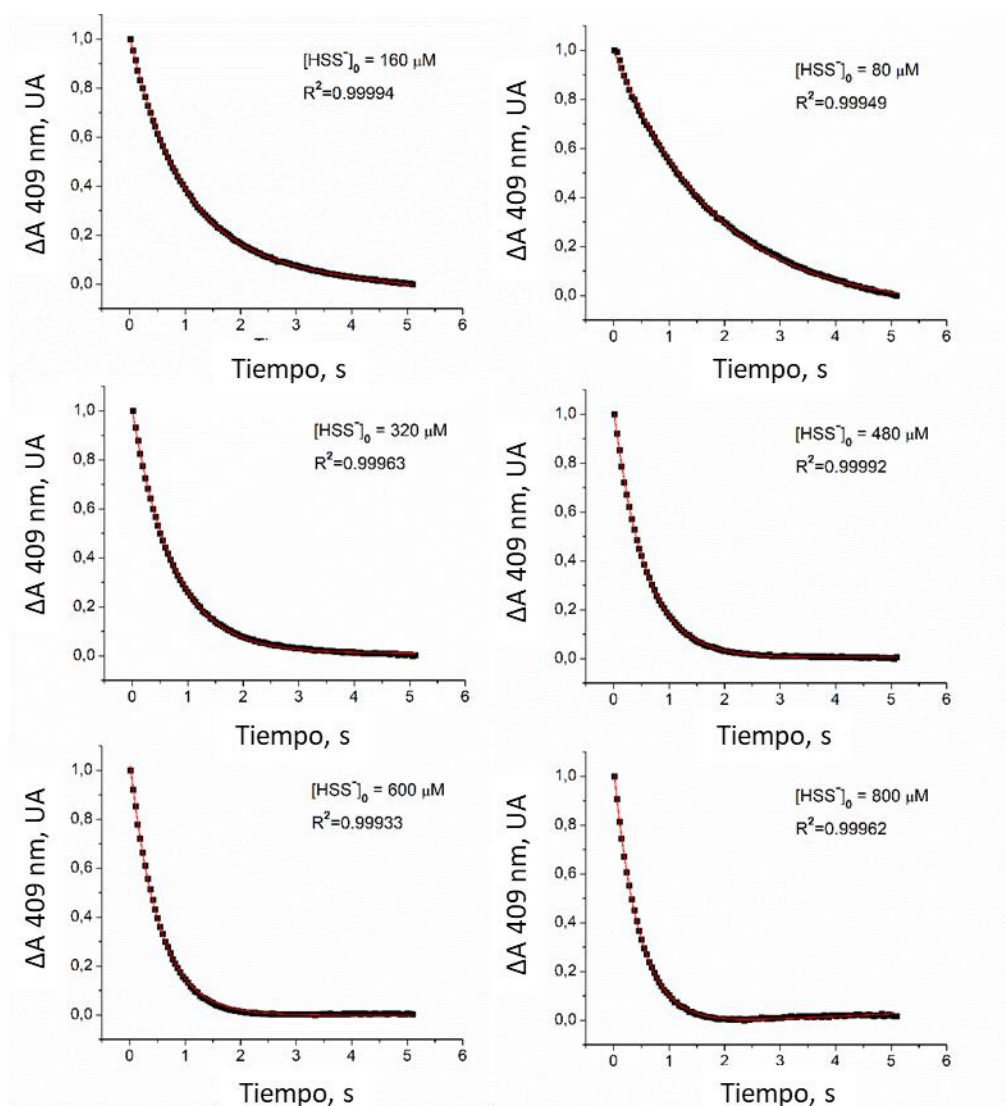


Figura 3.5. Ajustes de decaimiento de A_{409} para el agregado de HSS^- a MbFe^{III} en condiciones de flujo detenido. Los datos experimentales (cuadrados negros) se recogieron en condiciones de flujo detenido para $R_{\text{SS/Fe}} = 10, 20, 40, 60, 75$ y 100 (correspondientes a $[\text{HSS}^-]_0 = 80, 160, 320, 480, 600, 800 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente), $\text{pH} = 7.4$, y se superpusieron a funciones de ajuste monoexponencial (trazos rojos). Se presenta el valor R cuadrado de Pearson para todas las concentraciones iniciales de HSS^- .

De los ajustes monoexponenciales derivamos constantes experimentales, que llamaremos $k_{\text{obs,fast}}$. Estas constantes de decaimiento observadas presentaron una relación lineal con respecto a la concentración de HSS^- inicial. Los datos colectados permiten estimar una

constante de unión $k_{on} = (3.7 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La figura 3.6 muestra el ajuste lineal de las $k_{obs,fast}$ derivadas.

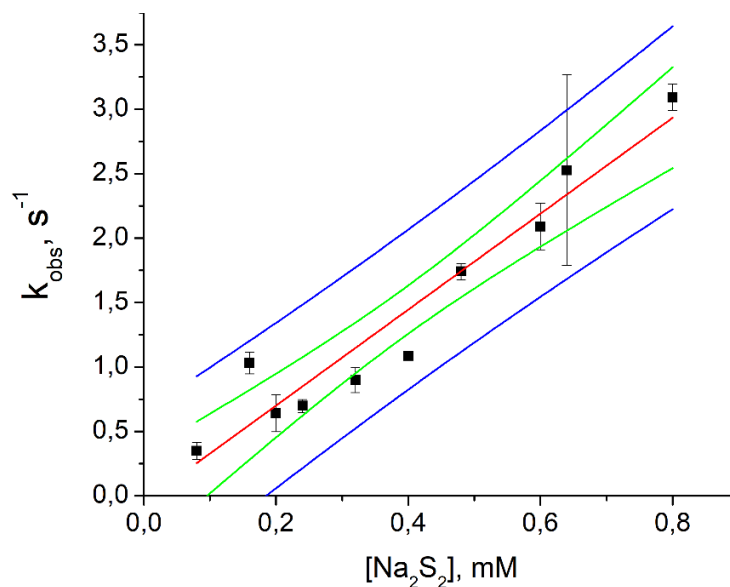


Figura 3.6. Regresión lineal (línea roja) de los valores $k_{obs,fast}$ derivados a pH 7.4 frente a $[HSS^-]_0$ ($10 \leq R_{SS/Fe} \leq 100$) con bandas de confianza del 95% (verde) y bandas de predicción del 95% (azul).

La presencia de un punto isobéptico en los cambios espectroscópicos (figura 3.1), el ajuste monoexponencial de los datos experimentales y la dependencia de las constantes observadas (figura 3.6), permiten sugerir que la constante cinética k_{on} corresponde al paso de coordinación de HSS^- a la mioglobina férrica (reacción 2.18 y ecuación 3.1).



$$v = -\frac{\partial MbFe^{III}(H_2O)}{\partial t} = k_{on}[MbFe^{III}(H_2O)][HSS^-] \quad (\text{ec 3.1})$$

El valor de k_{on} es aproximadamente un orden de magnitud menor que el valor reportado para la unión de H_2S/HS^- a $MbFe^{III}$ bajo condiciones similares ($k_{on}(H_2S) = 7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{9,143,174,187} Como hemos mencionado anteriormente, para el caso del sulfuro tanto la especie neutra H_2S como la aniónica HS^- coexisten a pH fisiológico ($pK_{a1}(H_2S) = 6.98$ a 25°C). La barrera energética de la migración es más baja para la especie neutra que para la aniónica.¹⁴³ Teniendo en cuenta este antecedente, y la especiación mayoritaria de disulfuro como HSS^- , es razonable que la k_{on} obtenida sea menor.

3.1.2 Dependencia de la constante de unión k_{on} con el pH

Como antecedente, la unión de H_2S y HS^- a $MbFe^{III}$ ha sido reportada y se observan cambios significativos en la constante de unión en función del pH (sección 1.4.1, figura 1.1.2).^{143,174} Las diferencias son atribuidas a la barrera energética que implica la desolvatación del ligando para acceder a la cavidad de la mioglobina. Un trabajo teórico posterior llevado a cabo por miembros del grupo, y cuya sección experimental es parte de esta Tesis, completa el estudio del proceso de coordinación estudiando tanto la migración del ligando hasta el sitio activo, al igual que el trabajo previo, como el paso de sustitución efectiva del ligando que se encuentra originalmente, que es una molécula de agua.²⁵³

Se registraron las trazas cinéticas de decaimiento de $MbFe^{III}$ (409 nm), por agregado de soluciones de Na_2S_2 ($R_{SS/Fe} = 10$ a 400) de forma análoga a la sección anterior (3.1.1), variando el pH entre 6.4 y 8.0. Los resultados se ajustaron razonablemente a funciones monoexponenciales a todos los pH de trabajo y en todas las relaciones molares $R_{SS/Fe}$ estudiadas. Los valores obtenidos de k_{on} en función del pH se muestran en la figura 3.7, en donde se comparan con valores registrados para la reacción con H_2S/HS^- .

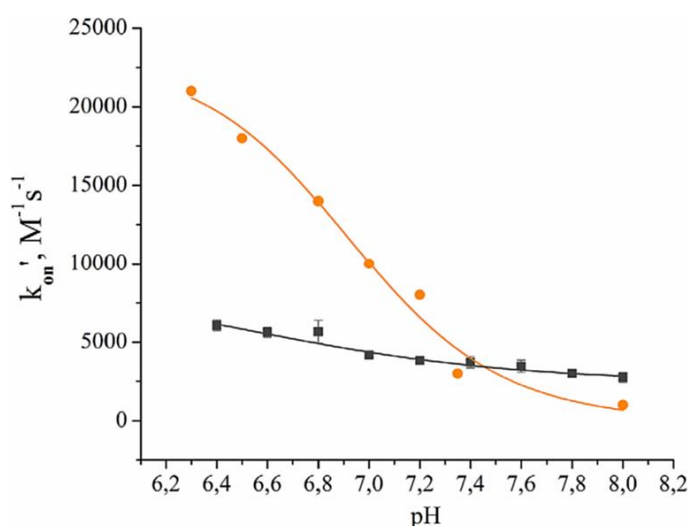


Figura 3.7. Constantes cinéticas de unión de HSS^- (gris) y HS^- (naranja) en función del pH. Las líneas llenas representan los ajustes logísticos 4PL para la estimación de la dependencia con el pH.

La constante $k_{on}(pH)$ no presenta variaciones significativas en el intervalo de pH entre 7.0 y 8.0. La especie neutra $HSSH$ está por debajo del 1% en dicho rango ($pK_{a1}=5.11^{34}$). A pH

menor se observa un aumento de k_{on} , que podría representar una contribución de HSSH, que se encuentra en un 3% o 5%, a pH 6.6 y 6.4, respectivamente. La diferencia sugiere que la constante intrínseca de la especie neutra $k_{int,HSSH}$ sería mayor que la de la especie aniónica, k_{int,HSS^-} .

El ajuste de funciones logísticas ofrece estimaciones para el pK_a de reactivos involucrados si el sistema es relativamente sencillo. Al no presentarse cambios significativos en la proteína en el rango de pH de trabajo, se puede atribuir la variación de la constante cinética con el pH a la especiación de HSSH/HSS⁻. El análisis es válido si se considera el intercambio de un solo protón. En este caso, la especie SS²⁻ no ha sido considerada porque representa una fracción despreciable a pH ≤ 8.0.

$$k_{on} = k_{int}^{H_2Sn} \cdot \alpha_{H_2Sn} + k_{int}^{HSn^-} \cdot \alpha_{HSn^-} = \frac{k_{int}^{H_2Sn} \cdot 10^{-pH}}{(K_{a1} + 10^{-pH})} + \frac{k_{int}^{HSn^-} \cdot K_{a1}}{(K_{a1} + 10^{-pH})} \quad (\text{ec. 3.2})$$

En el caso del sulfuro se observaba una tendencia consistente con su pK_{a1} (6.98), con un punto de inflexión cercano a pH = 7. En el caso de HSS⁻ es más difícil precisarlo, ya que ambas constantes de acidez ($pK_{a1} = 5.11$; $pK_{a2} = 10.03$) se encuentran fuera del intervalo de pH estudiado.

Además, de las asíntotas se pueden estimar las constantes intrínsecas de las especies involucradas en el equilibrio ácido-base que gobierna los cambios en k_{on} . En el caso del H₂S, han sido reportadas constantes intrínsecas $k_{int,H_2S} = (2.9 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y k_{int,HS^-} tendiendo a cero.¹⁴³ Para el caso de HSS⁻ estimamos un valor de constante de unión $k_{int,HSS^-} = (2.4 \pm 0.8) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. En cambio, no resultó posible estimar un valor razonable para la especie protonada HSSH, debido a que el ajuste presentaba un error relativo del 60%.

Una estimación más certera de la constante intrínseca de HSSH requeriría trabajar a valores de pH inferiores a 6.0, en los cuales la formación de azufre coloidal está favorecida e interfiere con las medidas espectroscópicas. No obstante esta limitación, el estudio de la constante intrínseca de la base conjugada HSS⁻ es pertinente teniendo en cuenta que es la especie mayoritaria a pH fisiológico, incluso en músculo esquelético donde el pH en reposo es cercano a 6.⁹⁸

3.2 Reducción de MbFe^{III} por HSS⁻

3.2.1 Dependencia de la constante cinética de reducción de MbFe^{III} con R_{SS/Fe}

Para el análisis cinético del proceso de reducción utilizamos espectroscopía convencional UV-Vis, de forma análoga a la sección 2.1. Utilizamos soluciones de MbFe^{III} 10⁻⁵ M, pH=7.4, T=25°C bajo atmósfera de argón. Agregamos Na₂S₂ para obtener relaciones molares iniciales R_{SS/Fe} entre 10 y 100. Las condiciones experimentales permiten hacer un tratamiento cinético de pseudo-orden teniendo en cuenta las relaciones molares empleadas. Sin embargo, concentraciones muy elevadas de HSS⁻ provocan una rápida formación de S₈ coloidal que interfiere con el registro de los espectros.

Para estudiar la cinética ajustamos la absorbancia a 434 nm mediante una función biexponencial (figura 3.8), teniendo en cuenta que el proceso de reducción ocurre luego de la coordinación de HSS⁻.

$$A_{\lambda t} = A_{\lambda 0} + \alpha \cdot e^{-t/\gamma_1} + \beta \cdot e^{-t/\gamma_2} \quad (\text{ec. 3.3})$$

Aunque el registro espectroscópico es similar al obtenido por agregado de sulfuro, el perfil cinético obtenido para la reacción de HSS⁻ con MbFe^{III} es diferente. Esto indica que no hay descomposición de HSS⁻ a H₂S antes o después de la coordinación.

Del ajuste biexponencial de cada traza cinética se derivan dos constantes de velocidad. La velocidad del paso de reducción del complejo MbFe^{III}(SSH⁻) a MbFe^{II} se estima a partir de la constante de velocidad lenta k_{obs,slow}.

La figura 3.9 muestra que la velocidad de reducción es prácticamente invariante con respecto a la concentración inicial de HSS⁻. Esta tendencia se corresponde con un orden cero respecto de [HSS⁻]. En estas condiciones, se estima a partir de la ordenada al origen una k_{red} = (1.0 ± 0.1) x 10⁻² s⁻¹ a pH = 7.4. Consideramos que esto también es una evidencia experimental de que la reducción está gobernada por la concentración del complejo.

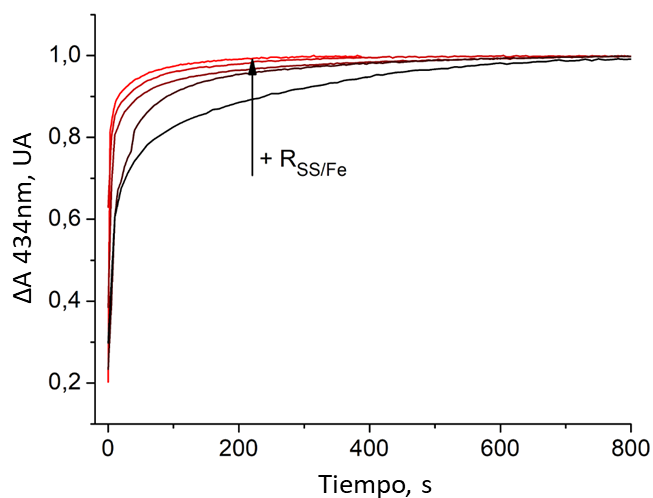


Figura 3.8. Cambios de absorbancia normalizada a 434 nm de MbFe^{III} tras la adición de solución de Na_2S_2 , para $R_{\text{SS}/\text{Fe}} = 10, 25, 40, 50, 60$ (líneas negras a rojas) a pH 7.4, 25 °C, bajo atmósfera de argón.

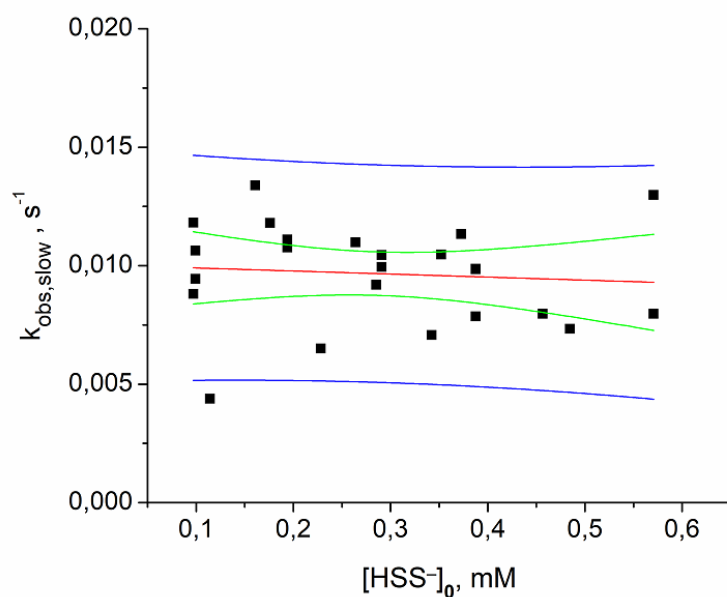


Figura 3.9. Regresión lineal (línea roja) de los valores $k_{\text{obs,slow}}$ derivados a pH 7.4 frente a $[\text{HSS}^-]_0$ ($10 \leq R_{\text{SS}/\text{Fe}} \leq 60$), con bandas de confianza del 95% (verde) y bandas de predicción del 95% (azul).

Además de la dependencia con la concentración de HSS^- , es de interés estudiar la dependencia con el pH para elucidar el mecanismo de esta reacción. Como ya mencionamos, $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ y $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})$ podrían estar en equilibrio, y su reactividad podría ser distinta debido a la desprotonación del ligando.

3.2.2 Dependencia de la constante cinética de reducción de MbFe^{III} con el pH

Para el estudio de la dependencia de la reducción de MbFe^{III} mediada por HSS^- con la variación de pH, se consideraron los valores de pH 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.6, 7.8 y 8.0, en condiciones idénticas a las empleadas a pH 7.4 (sección 3.2.1). Los pH inferiores a 6.6 se excluyeron del estudio, debido a la formación de S_8 coloidal, incluso a $R_{\text{SS/Fe}}$ bajas.

Los resultados experimentales de $k_{\text{obs,slow}}$ para la variación de $[\text{HSS}^-]_0$ a diferentes pHs se presentan en la figura 3.10. Observamos que $k_{\text{obs,slow}}$ es casi invariante con $[\text{HSS}^-]_0$ para cada valor de pH estudiado, en forma análoga a lo observado a pH 7.4. Esta observación era esperable, ya que HSS^- es prácticamente la única especie de disulfuro en el intervalo de pH evaluado.

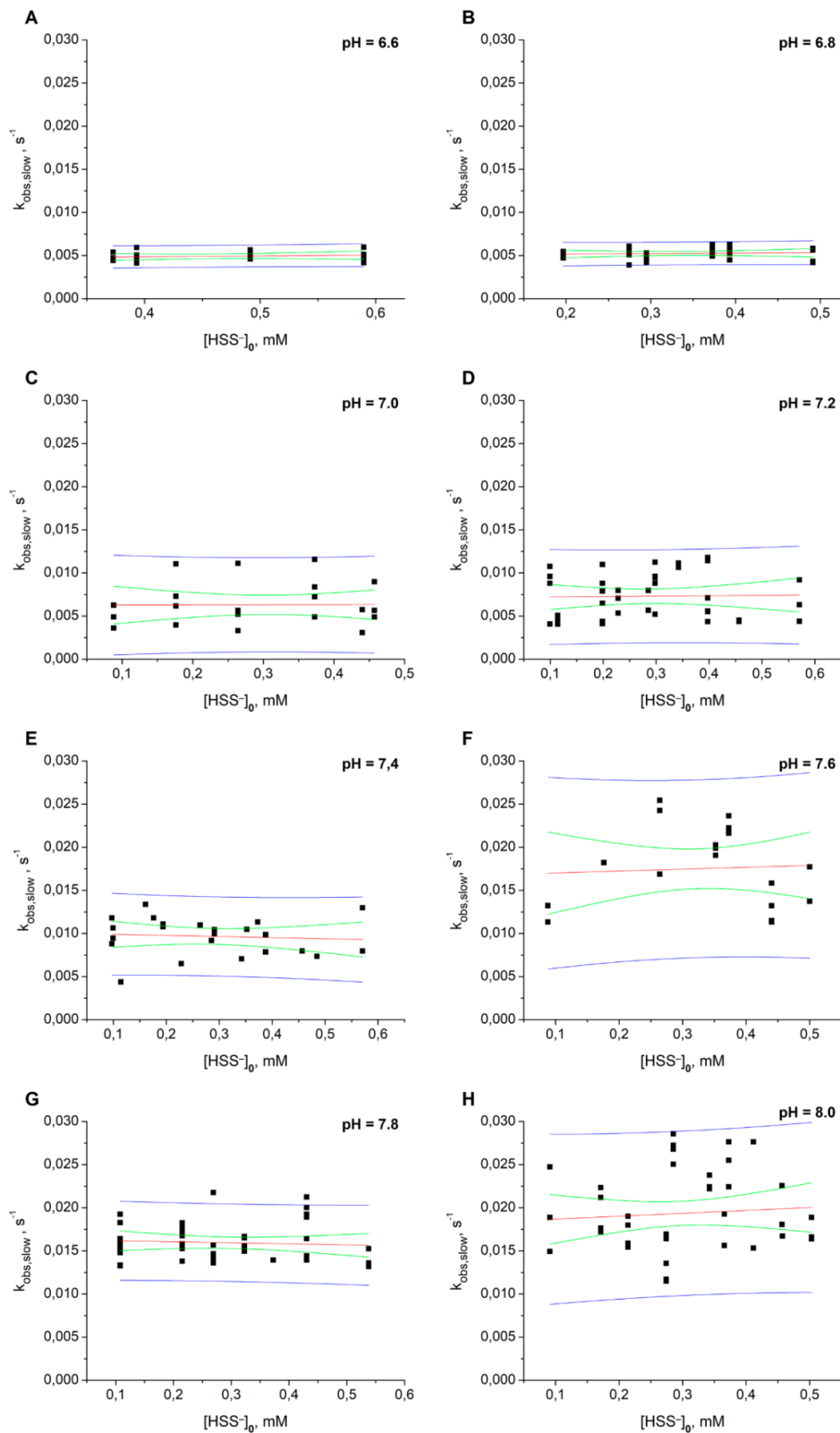


Figura 3.10. Estimación de k_{red} a distintos pH, a partir de los valores de $k_{obs,slow}$ versus $[HSS^-]_0$ ($10 \leq R_{SS/Fe} \leq 60$), pH 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 y 8.0 (Paneles A-H respectivamente).

Derivamos k_{red} como una función del pH, después de repetir el análisis cinético de $k_{obs,slow}$ para cada pH. Los resultados se presentan en la figura 3.11.

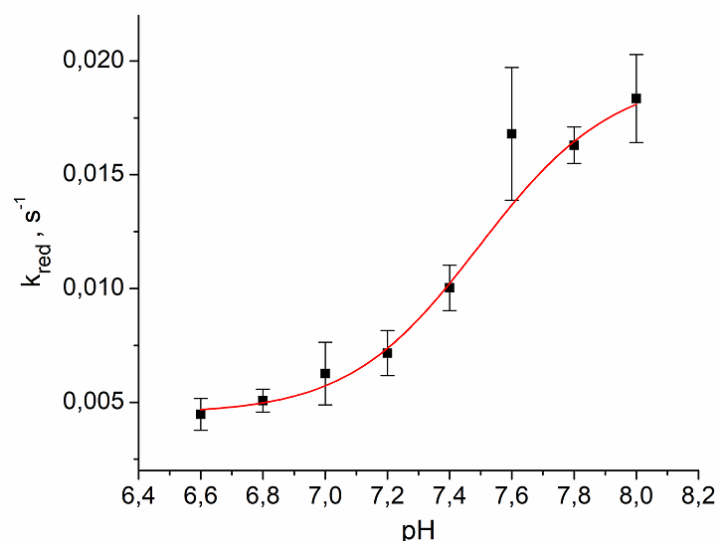


Fig. 3.11. Variación de k_{red} en función del pH (puntos cuadrados negros). Las barras de error representan la desviación estándar de la intersección de las regresiones lineales. Los datos experimentales se ajustaron mediante una curva sigmoidea (línea roja).

Los valores de $k_{red}(pH)$ pueden ser ajustados por una curva sigmoidea 4PL. Proponemos que esta curva refleja el equilibrio ácido-base para la desprotonación del complejo $MbFe^{III}(HSS^-)/MbFe^{III}(SS^{2-})$, y que permite estimar un valor de pK_{a2} del ligando coordinado conforme la reacción 3.1.



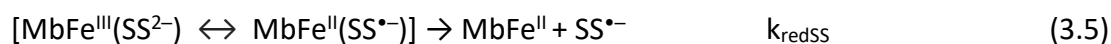
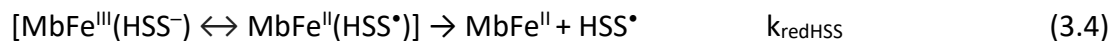
Derivamos el valor de $pK_{a2} = 7.50 \pm 0.09$ a partir del punto de inflexión del ajuste de la curva sigmoidea de la figura 3.11. También estimamos valores para las constantes de velocidad intrínsecas $k_{redHSS} = 0.0045 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ y $k_{redSS} = 0.020 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ a partir de los valores asintóticos inferior y superior del ajuste, respectivamente. A diferencia de lo que ocurría con la derivación de la constante de unión intrínseca para HSSH, las constantes intrínsecas de reducción presentan menor error relativo. Por lo tanto, la constante de equilibrio ácido-base para la cupla $MbFe^{III}(HSS^-)/MbFe^{III}(SS^{2-})$, desempeña un papel en la regulación de la velocidad de la etapa de reducción, de acuerdo con los datos experimentales. La diferencia

de velocidad a favor del ligando desprotonado es esperable teniendo en cuenta la diferencia de carga.

Al igual que con los complejos de sulfuro, estas especies pueden ser descriptas como contribuciones de dos formas resonantes.



Proponemos, que la formación de los productos finales obedece entonces a una homólisis reductiva de cualquiera de los dos complejos (reacciones 3.4 y 3.5), teniendo en cuenta la especiación al pH del medio.



Junto con la MbFe^{II} , se forma la cupla ácido-base radicalaria $\text{HSS}^\bullet/\text{SS}^{\bullet-}$. En el mecanismo de reducción mediada por sulfuro, los radicales formados resultaron parte crucial del mecanismo por ser los precursores de las especies catalíticas. Es de nuestro interés evaluar el rol que ocupan en el mecanismo de reducción mediada por HSS^- , ya que se trata de radicales oxidantes.

3.2.3 Reducción de MbFe^{III} por HSS^- en presencia de atrapantes de radicales

Realizamos en experimentos de reducción de MbFe^{III} por HSS^- en condiciones anóxicas, en presencia de atrapantes de radicales DMPO y PBN, con el fin de evaluar la participación de alguna especie radicalaria en el mecanismo de reacción. Se utilizaron 200 equivalentes de DMPO o de PBN. Como se observa en la figura 3.12, el agregado de los atrapantes no tuvo efectos significativos sobre la cinética de formación de MbFe^{II} .

Por lo tanto, los radicales en este caso no cumplen un rol determinante en la velocidad del proceso global. Esta observación experimental sugiere que HSS^- gobierna la velocidad de la reducción de MbFe^{III} .

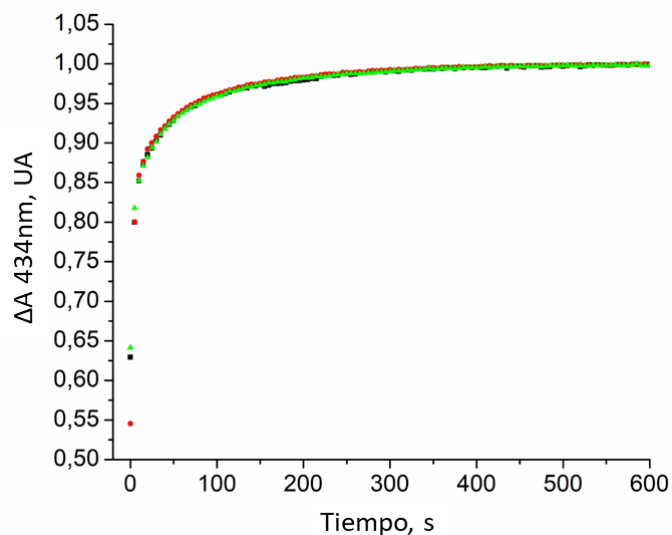


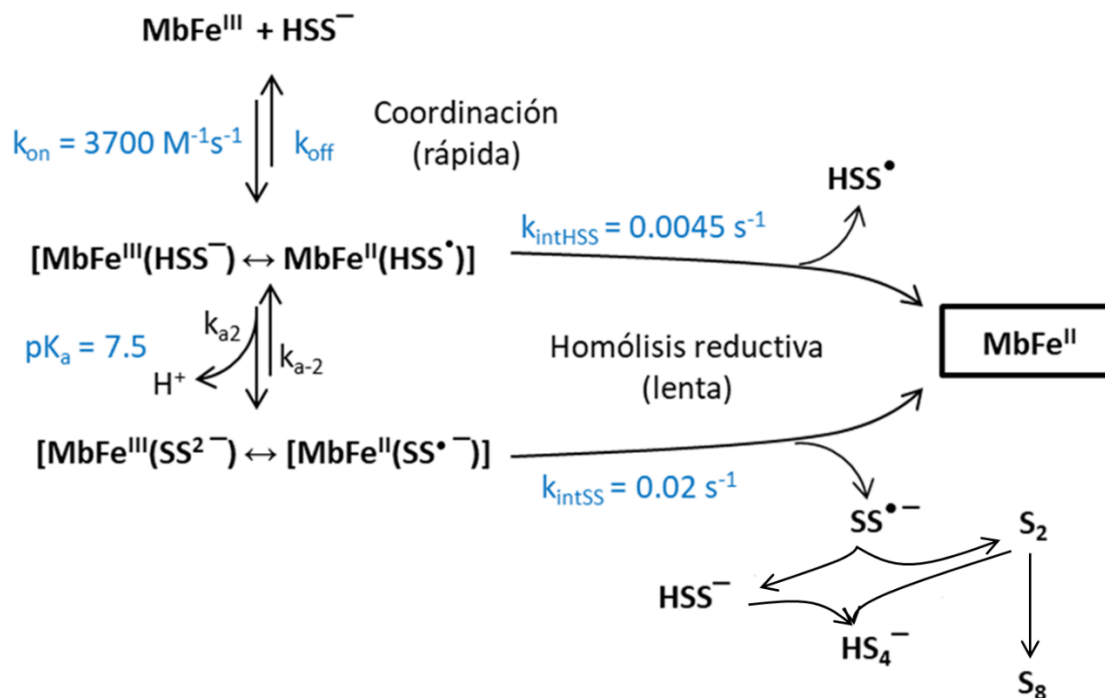
Figura 3.12. Ensayo de atrapamiento con PBN o DMPO. Trazas cinéticas a 434 nm para la reacción de MbFe^{III} con Na_2S_2 ($R_{\text{SS/Fe}}=40$) en condiciones anóxicas, $\text{pH}=7.4$, 25°C , en ausencia de atrapantes de radicales (negro), en presencia de 200 equivalentes de PBN (rojo) y en presencia de 200 equivalentes de DMPO (verde).

Desde el punto de vista teórico, el radical $\text{HSS}^\bullet$ es más estable que el radical $\text{HS}^\bullet$, como sugiere el diagrama de Frost para especies reactivas del azufre presentado en la introducción (sección 1.1.4).⁴⁷ En cuanto a sus destinos posibles, ya han sido discutidos en el final de la sección 2.3.1.

3.3 Mecanismo de reducción de MbFe^{III} mediada por disulfano

A partir de las evidencias experimentales espectroscópicas y cinéticas presentadas en las secciones anteriores, proponemos un mecanismo para la reducción de MbFe^{III} mediada por HSS^- . El mecanismo de reacción propuesto se muestra en el esquema 3.1.

Una vez unido, como la unión al Fe^{III} electrofílico aumenta el carácter ácido de las especies unidas (como sucede con H_2S), el complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-)$ puede desprotonarse para obtener así una especie coordinada por el dianión $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})$, con un $\text{pK}_{\text{a}2} = 7.5$. Por lo tanto, ambos estados de protonación pueden coexistir en un entorno de pH fisiológico.



Esquema 3.1. Propuesta mecanística para la reducción de MbFe^{III} mediada por HSS^- .

La coordinación inicial de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ se describe mediante la ecuación diferencial 3.4. La constante de unión k_{on} se obtiene a partir de la pendiente de la dependencia lineal de $k_{\text{obs,fast}}$ con la concentración inicial variable de $[\text{HSS}^-]_0$ (sección 3.1.1, figura 3.6).

$$-\frac{\delta[\text{MbFe}^{\text{III}}]}{\delta t} = k_{\text{on}}[\text{MbFe}^{\text{III}}][\text{HSS}^-] = k_{\text{obs,fast}}[\text{MbFe}^{\text{III}}] \quad (\text{ec. 3.4})$$

Luego, el complejo $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$ entra en equilibrio con su base conjugada ($\text{pK}_{\text{a}2} = 7.5$), y ambas especies de la cupla producen la reducción del centro metálico por homólisis reductiva ($k_{\text{redHSS}} = 0.0045 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{redSS}} = 0.02 \text{ s}^{-1}$). La velocidad observada a un determinado pH es la resultante de la combinación lineal entre sus contribuciones (ecuación 3.5).

$$\frac{\delta[\text{MbFe}^{\text{II}}]}{\delta t} = k_{\text{redHSS}}[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-)] + k_{\text{redSS}}[\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})] \quad (\text{ec. 3.5})$$

Así, la constante mixta de velocidad dependiente del pH para la homólisis reductiva, k_{red} , puede calcularse para valores de pH dentro del intervalo de 6.6 a 8.0 como se muestra en la ecuación 3.6.

$$k_{\text{red}} = k_{\text{redSS}} \frac{K_{\text{a}2}}{[\text{H}^+] + K_{\text{a}2}} + k_{\text{redHSS}} \left(1 - \frac{K_{\text{a}2}}{[\text{H}^+] + K_{\text{a}2}}\right) \quad (\text{ec. 3.6})$$

La observación a tiempos largos de S_8 coloidal sugiere el destino de los radicales $HSS^\bullet$ y $SS^{\bullet-}$, que de acuerdo con la literatura podrían dismutar a S_2 y HSS^- ,⁴⁷ o avanzar por la vía de los polisulfuros de cadena larga,^{34,106} en ambos casos llegando como producto final a S_8 .

3.3.1 Simulación de sistemas cinéticos mediante ecuaciones diferenciales. Estimación de constantes cinéticas

Utilizando el software COPASI obtuvimos perfiles cinéticos simulados para los reactivos (figura 3.13), productos e intermediarios de reacción del mecanismo propuesto (esquema 3.1). Realizamos simulaciones con $R_{SS/Fe}$ variable ($6.6 \leq pH \leq 8.0$) a pH 7.4, y también con pH variable ($6.6 \leq pH \leq 8.0$) manteniendo $R_{SS/Fe} = 40$. Para las simulaciones se utilizaron las constantes de velocidad reportadas y medidas experimentalmente (tabla 3.2).

Reacción	Parámetros cinéticos	Referencias
$H_2S_2 \rightleftharpoons HS_2^- + H^+$	$k_a = 1 \times 10^4 s^{-1}$ $k_b = 1.26 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$	A partir de $K_{a1} = 7.94 \times 10^{-6}$
$HS_2^- \rightleftharpoons S_2^{2-} + H^+$	$k_a = 10 s^{-1}$ $k_b = 1 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$	A partir de $K_{a2} = 1 \times 10^{-10}$
$MbFe^{III} + HS_2^- \rightleftharpoons MbFe^{III}(SSH^-)$	$k_{on} = 3.7 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ $k_{off} = 5 s^{-1}$	Medido en flujo detenido <i>Estimado (COPASI)</i>
$MbFe^{III}(SSH^-) \rightleftharpoons MbFe^{III}(SS^{2-}) + H^+$	$k_{a-2} = 10 s^{-1}$ $k_{a2} = 3.16 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$	Ajuste k_{red} vs pH; $pK_{a2} = 7.50$
$MbFe^{III}(HSS^-) \rightarrow MbFe^{II} + HSS^\bullet$	$k_{redHSS} = 4.5 \times 10^{-3} s^{-1}$	Ajuste k_{red} vs pH
$MbFe^{III}(SS^{2-}) \rightarrow MbFe^{II} + SS^{\bullet-}$	$k_{redSS} = 2 \times 10^{-2} s^{-1}$	Ajuste k_{red} vs pH

Tabla 3.2. Reacciones del modelo utilizado para las simulaciones COPASI y parámetros cinéticos derivados.

Se estimó la constante de liberación, $k_{off} = 5 s^{-1}$. Las reacciones de desprotonación de HSSH libre,³⁴ y coordinado (sección 3.2.2) fueron modeladas mediante reacciones reversibles, con pasos elementales de velocidad difusional o mayor, y respetando las constantes de equilibrio experimentales.

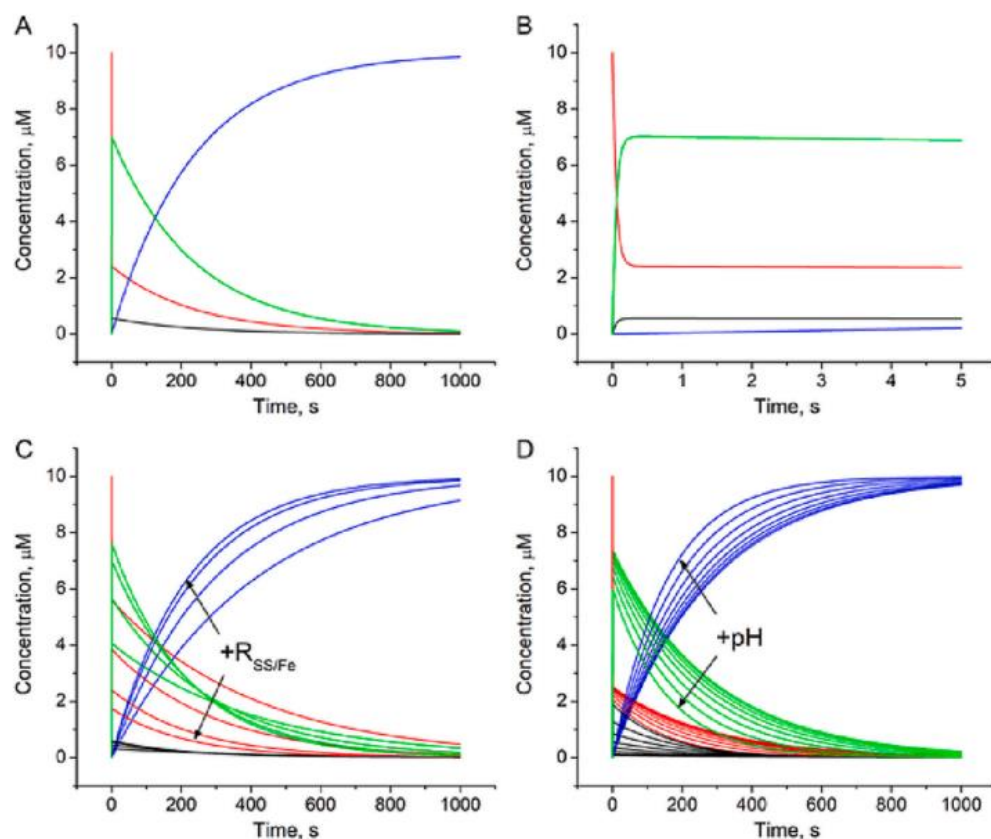


Figura 3.13. Simulación de la reacción de MbFe^{III} con Na_2S_2 . A) Trazas completas (1000 s), $\text{pH} = 7.4$, $R_{\text{SS/Fe}} = 40$, B) Trazas iniciales (5 s), $\text{pH} = 7.4$, $R_{\text{SS/Fe}} = 40$. C) pH fijo ($\text{pH} = 7.4$), relación variable ($10 \leq R_{\text{SS/Fe}} \leq 60$). D) Relación fija ($R_{\text{SS/Fe}} = 40$), pH variable ($6.6 \leq \text{pH} \leq 8.0$). MbFe^{III} , trazas rojas; $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SSH}^-)$, trazas verdes; $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})$, trazas negras; MbFe^{II} , trazas azules.

En la Fig. 3.12, los paneles A y B muestran el comportamiento simulado del modelo de reacción con $R_{\text{SS/Fe}} = 40$ a $\text{pH} = 7.4$, considerando el tiempo de reacción completo (panel A) y centrándose en el paso inicial rápido (panel B). Los paneles C y D muestran que el modelo responde adecuadamente a los cambios de concentración inicial de HSS^- y a los cambios de pH , respectivamente.

3.4 Interferencia del O_2 : formación de sulfmioglobina ferrosa

Además de la coordinación y reacciones redox en el centro metálico, el agregado de sulfuro o disulfuro a la MbFe^{III} puede conducir a la formación de un producto de incorporación de azufre al anillo porfirínico, formando un compuesto de color verde llamado sulfmioglobina ferrosa, $\text{sulfMbFe}^{\text{II}}$ (sección 1.4.4).

La formación de sulfhemos ha sido reportada como reacción secundaria en diversos trabajos que involucran hemoproteínas y RSS.^{141,200,227} Los estudios sobre la formación de estas especies avalan la hipótesis de que la formación de sulfhemos requiere la participación del oxígeno, vía formas hipervalentes tipo MbFe^{IV} ,^{186,307–309} y que en condiciones anóxicas no observa su formación.³¹⁰

En nuestras manos, en algunos experimentos de reducción de MbFe^{III} mediada por H_2S o HSS^- , observamos la formación de una señal en el espectro UV-Vis a 617 nm correspondiente a la formación de $\text{sulfMbFe}^{\text{II}}$ como producto secundario. Como fue mencionado oportunamente, esos experimentos fueron descartados, ya que la presencia de dicho compuesto representaba una interferencia para la obtención de registros cinéticos sobre la reducción centrada en el metal. Un ejemplo de estos experimentos se muestra en la figura 3.14.

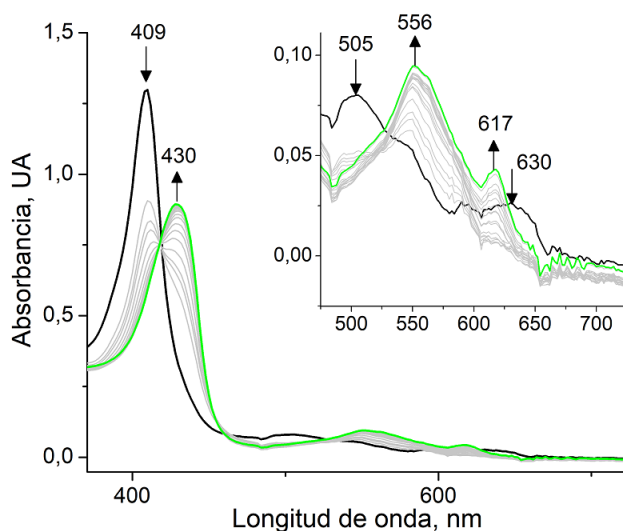
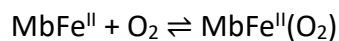


Figura 3.14. Reacción entre $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ 10 μM y Na_2S_2 400 μM , 25°C, pH 7.4, bajo atmósfera de argón con interferencia de O_2 . $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ en negro; espectro final en verde. Los espectros intermedios se muestran en gris.

Realizando el experimento de agregado de Na_2S_2 a MbFe^{III} en condiciones aeróbicas, también se observa la formación de $\text{sulfMbFe}^{\text{II}}$, junto con señales en 416, 545 y 580 nm (figura 3.15), consistentes con la formación de $\text{MbFe}^{\text{II}}(\text{O}_2)$, reacción 1.57. El mismo comportamiento se observa en registros reportados.¹⁴¹



(1.57)

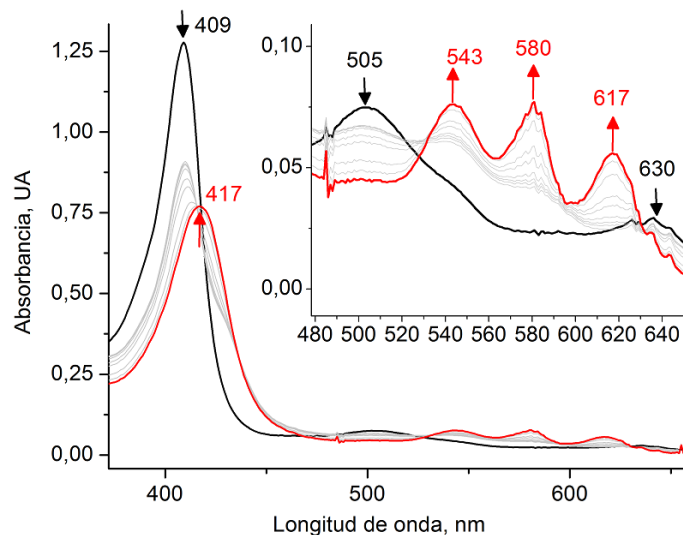


Figura 3.15. Reacción entre $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ 8 μM y Na_2S_2 200 μM , 25°C, pH 7.4, condiciones aeróbicas. Espectro inicial de $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})$ en negro, espectro final en rojo. Los espectros intermedios se muestran en gris.

Tanto en términos estructurales como mecanísticos, la formación de sulfhemos continúa en estudio, ya sea por la consideración de los requerimientos de la proteína,³⁰⁷ los del grupo hemo,^{220,310} la fuente de azufre,^{141,200,227} o el requerimiento de oxígeno.^{186,307–310}

Fue reportado que la adición del átomo de S en la formación de sulfhemo podría suceder en los anillos A o B del grupo hemo,²¹⁴ que son los que contienen un grupo vinilo como sustituyente. Este antecedente motivó la evaluación de la reactividad de apomioglobina reconstituida con grupos prostéticos sin vinilo, respecto de la formación de sulfhemos.³¹¹ Específicamente usaron apomioglobina reconstituida con mesohemina o deuterohemina, en las cuales los grupos vinilo son reemplazados por grupos etilo o átomos de H respectivamente (figura 3.16). En ambos casos fue reportada la formación de la sulfmioglobina correspondiente.³¹¹

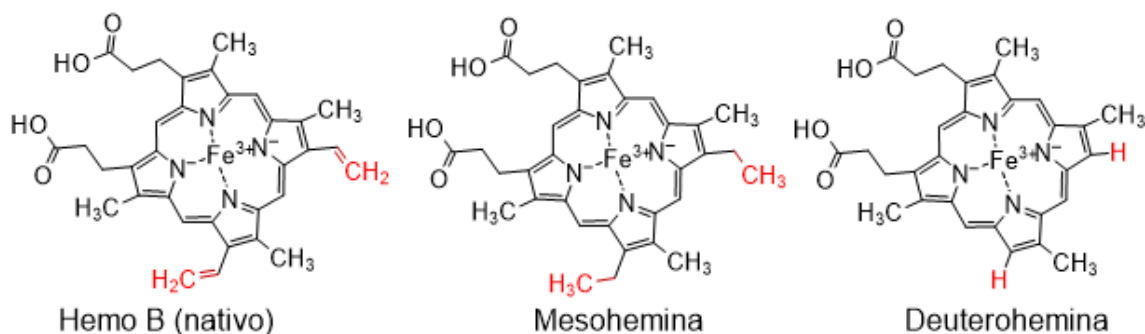


Figura 3.16. Estructuras moleculares de hemo tipo b, mesohemina y deuterohemina. Los sustituyentes diferenciales entre las tres especies están indicados en color rojo.

Sin embargo, los autores señalaron que las características estructurales de los productos obtenidos resultaron distintas para las dos mioglobinas reconstituidas, indicando que pueden formarse diferentes tipos de sulfhemo dependiendo del grupo prostético de partida y de sus sustituyentes periféricos. Un estudio sobre la influencia de los grupos vinilo en la formación de sulfhemo se centró en el tipo de estructura que adoptaban los sulfhemos formados.³¹² Los autores concluyeron que el vinilo facilita la formación de sulfhemo tipo C, con la formación de un ciclo fusionado al anillo B, presumiblemente más estable que los sulfhemos tipo A y B (sección 1.4.4, figura 1.13).

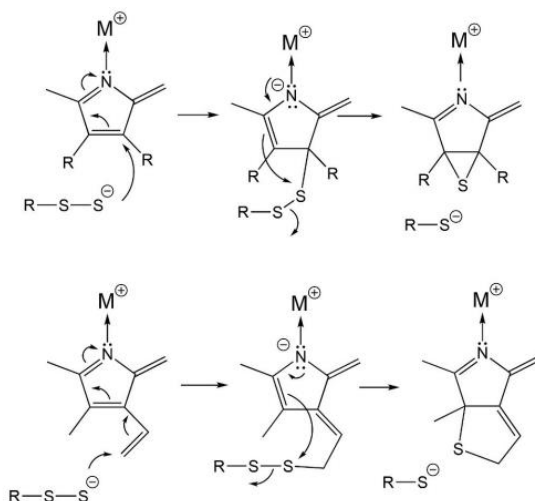


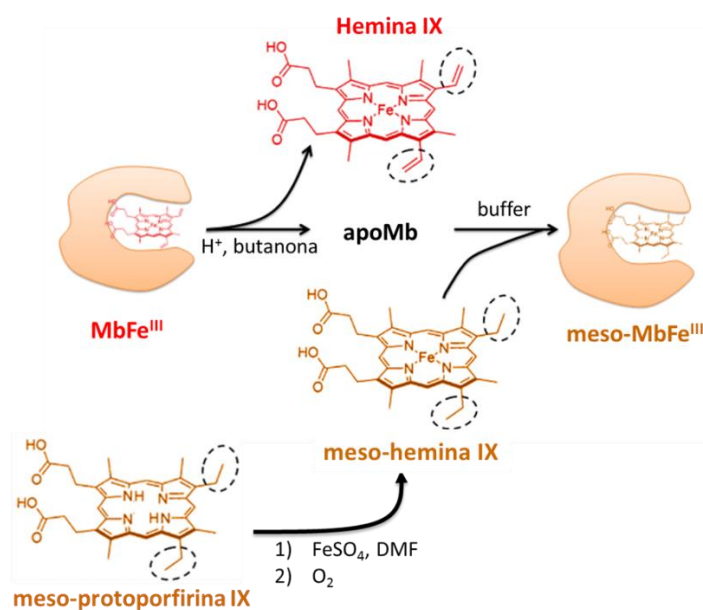
Figura 3.17. Mecanismos propuestos para la formación de sulfhemo a partir de $MbFe^{III}$ y RSS^- (R = alquil o H). Arriba se muestra el mecanismo por vía de formación de episulfuro; abajo se muestra un mecanismo alternativo por ataque nucleofílico sobre el sustituyente vinílico. Extraído de Álvarez et al. (2020).

También, como se mencionó en el Capítulo introductorio (sección 1.4.4), un reporte más reciente propone un mecanismo de formación secundaria de sulfhemo por ataque directo de HSSH/HSS⁻ o de RSSH sobre el anillo B (figura 3.17).²²⁷ Este mecanismo no se inicia con una especie Fe^{IV}, sino que se inicia por reacción de MbFe^{III} con HSS⁻ o con RSS⁻ en condiciones aeróbicas.

Propusimos el estudio de la reacción de HSS⁻ con mioglobina reconstituida con mesohemina IX (mesoMbFe^{III}). La hipótesis de trabajo fue que esta reconstitución permitiría obtener una hemoproteína menos sensible a la formación de sulfhemo por agregado de HSS⁻, y así obtener registros cinéticos libres de interferencia por sulfhemo, que no demanden estricto control de ausencia de oxígeno.

Reconstitución de mioglobina con Mesohemina IX

La proteína fue reconstituida a partir de los protocolos reportados,^{311,313} extrayendo el hemo nativo por extracción con butanona y ácido clorhídrico, y reconstituyendo la proteína con mesohemina IX, obtenida a partir de mesoporfirina IX comercial, por inserción del hierro a partir de FeSO₄ (esquema 3.2).³¹⁴ El protocolo completo se encuentra en la sección 3.6.



Esquema 3.2. Síntesis de meso-MbFe^{III}.

La inserción del metal en la mesoprotoporfirina IX para obtener la meso-hemina IX fue seguida por espectroscopía UV-Vis.³¹⁵

La mesoMbFe^{III} obtenida muestra un espectro con un patrón de bandas similares a la MbFe^{III}. La banda de Soret y las bandas Q de la hemina presentan un corrimiento hipsocrómico respecto de la proteína nativa. La banda de Soret está centrada en 396 nm, acompañada de una banda Q en 492 nm y una banda de transferencia de carga a 620 nm. La banda centrada en 280 nm correspondiente a los residuos proteicos aromáticos no presenta corrimiento. El espectro observado es consistente con el reportado.³¹¹ El espectro de la mesoMbFe^{III} se presenta junto con el espectro de la proteína nativa MbFe^{III} en la figura 3.18.

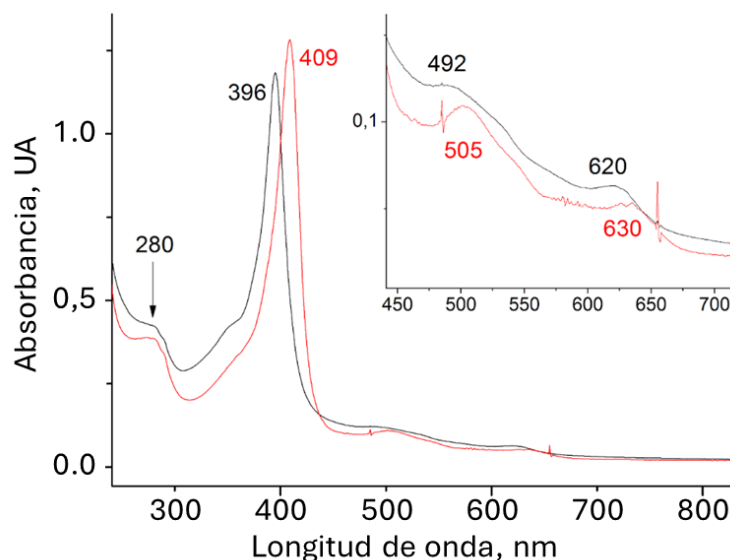


Figura 3.18. Espectroscopía UV-vis, pH = 7.4. MbFe^{III} nativa (rojo) y mesoMbFe^{III} (negro), ambas en una concentración de 10 μ M.

Por reducción con ditionito, se observa un espectro con banda de Soret a 422 nm y una única banda Q a 545 nm, consistente con la formación de la especie pentacoordinada ferrosa, mesoMbFe^{II}. El agregado de O₂ sobre mesoMbFe^{II} da como resultado un espectro con una banda de Soret en 403 nm y bandas Q bien resueltas en 532 y 567 nm, consistentes con la formación de mesoMbFe^{II}(O₂), reacción 3.6. Los espectros se presentan en la figura 3.19.



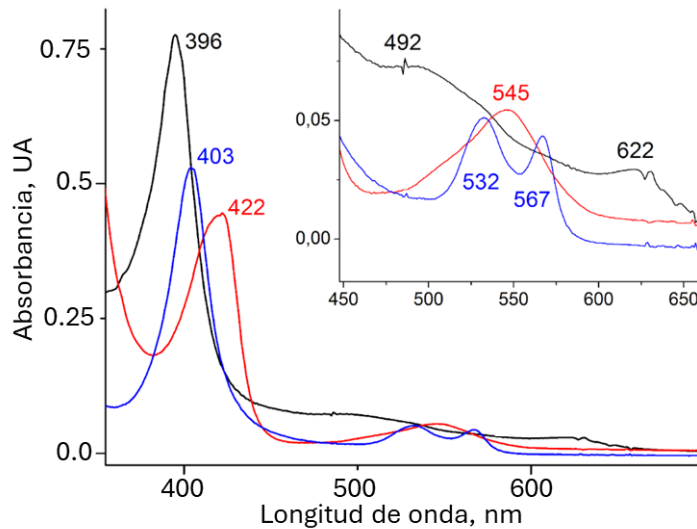
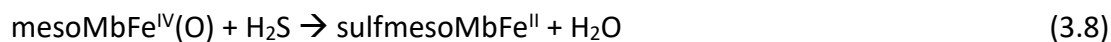
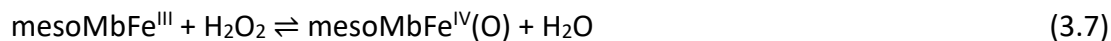


Figura 3.19. Espectro UV-Visible de meso-MbFe^{III} (negro); luego del agregado de ditionito (rojo) y posterior agregado de oxígeno (azul).

Adicionalmente preparamos sulfmesoMbFe^{II} a partir de mesoMbFe^{III} (10 μM) por agregado sucesivo de una cantidad estequiométrica de H₂O₂ (reacción 3.7) y posterior agregado de Na₂S en exceso (reacción 3.8).



Con el agregado de Na₂S observamos un viraje al verde, característico de los sulfhemos. Registramos un espectro con una banda de Soret en 409 nm, bandas Q en 532 y 560 nm, y una banda de transferencia de carga a 610 nm, consistentes con las bandas reportadas para la formación de sulfmesoMbFe^{II}.³¹¹

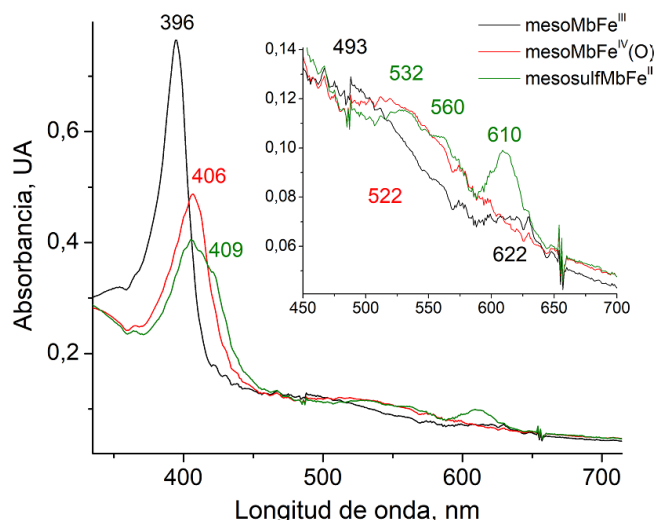


Figura 3.20. Espectros UV-Vis de mesoMbFe^{III} (negro); agregado de H₂O₂ (rojo); agregado de Na₂S (verde).

Reactividad comparativa de mesoMbFe^{III}, MbFe^{III} frente a soluciones de Na₂S₂.

Llevamos a cabo seguimientos cinéticos de reactividad de soluciones de Na₂S₂ frente MbFe^{III} y mesoMbFe^{III}, a partir de soluciones purgadas con argón (figura 3.21, panel A y B). Para iguales condiciones de purga, en el caso de la MbFe^{III}, observamos la aparición de una banda de absorción a 617 nm, característica de sulfMbFe^{II}.²¹⁰ Además, las otras bandas del espectro están desplazadas respecto de las que corresponden a MbFe^{II} (434 y 556 nm). Por el contrario, en el caso de la mesoMbFe^{III}, el producto final obtenido tiene las bandas correspondientes a mesoMbFe^{II} (422 y 545 nm), y no se observa absorción a 610 nm. En condiciones anóxicas estrictas no se observa formación de sulfhemo.

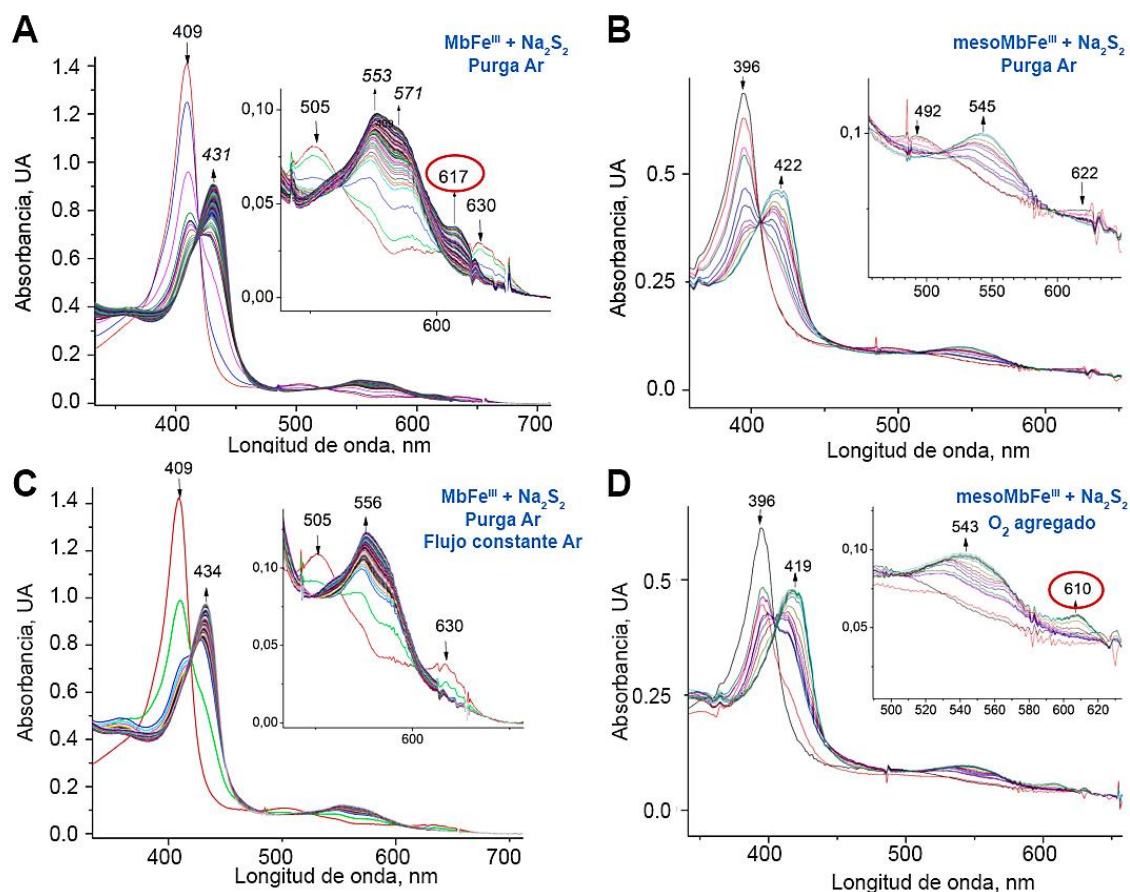


Figura 3.21. Cambios en el espectro UV-Vis luego del agregado de 50 equivalentes de Na_2S_2 a: A) MbFe^{III} en anoxia sin campana de argón; B) $\text{meso-MbFe}^{\text{III}}$ en anoxia sin campana de argón; C) MbFe^{III} en anoxia con campana de argón; B) $\text{meso-MbFe}^{\text{III}}$ en hipoxia; Todos los experimentos se realizaron a 25°C , $\text{pH}=7.4$.

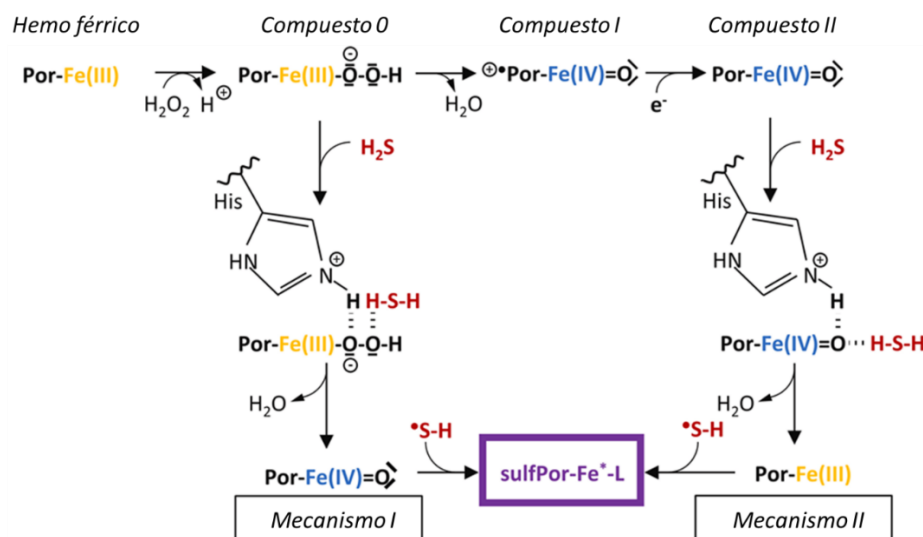
Se realizaron dos experimentos de control. En primer lugar, repetimos la reacción de MbFe^{III} con Na_2S_2 manteniendo el sistema bajo una campana de argón durante el tiempo de reacción. El resultado es la formación de MbFe^{II} con las bandas correspondientes a 434 y 556 nm, sin bandas correspondientes a $\text{sulfMbFe}^{\text{II}}$ (figura 3.21, panel C). Esto sugiere que la formación de $\text{sulfMbFe}^{\text{II}}$ en el ensayo del panel A se debe al ingreso espurio de O_2 . Por último, repetimos la reacción de $\text{mesoMbFe}^{\text{III}}$ con Na_2S_2 , agregando O_2 al sistema luego del mezclado de los reactivos. El resultado es el desarrollo de una banda de absorción a 610 nm, característica de $\text{sulfmesoMbFe}^{\text{II}}$, que interfiere en la lectura de los máximos correspondientes al producto deseado $\text{mesoMbFe}^{\text{II}}$.

De estos ensayos, concluimos que ambas proteínas son capaces de formar sulfhemos, pero la mesoMbFe^{III} resultaría menos susceptible frente a la presencia de trazas de O₂. Además, corroboramos que la presencia de O₂ es necesaria para el desarrollo de sulfhemos.

Especulamos que el grupo vinilo podría favorecer la formación de sulfhemo tipo C (sección 1.4.4, figura 1.14) en línea con lo reportado en la formación de sulfMbFe^{II}.³¹² La conjugación del doble enlace exocíclico podría ser un factor estabilizante que favorezca la formación de sulfhemo en la proteína nativa.

Estos resultados sugieren que el uso de la mesoMbFe^{III} resultaría experimentalmente menos demandante para el controlar la formación de sulfhemos, usando disulfuro como reactivo. Esto podría explicarse, en términos especulativos, o bien por la formación de formas de tipo sulfhemo reversibles, o bien por la menor estabilidad de un sulfhemo tipo C, con el heterociclo de 5 miembros, fusionado.

Las investigaciones sobre los mecanismos de formación de sulfhemos usando disulfuro son aún incipientes. Para el caso de formación de sulfhemos por sulfuro, además de la naturaleza del grupo prostético, han sido realizados estudios para evaluar el rol de los aminoácidos de la cavidad distal de las hemoproteínas en la formación de sulfhemos. Ha sido propuesto que un residuo de histidina en la cavidad distal participa en el mecanismo, y asiste a la formación de sulfhemo, vía compuesto 0 o compuesto II, aunque no sería condición suficiente.^{316,317} Estas propuestas contemplan la participación necesaria de ligandos oxigenados en ambos casos para la activación del grupo prostético. Con la interacción posterior de H₂S, proponen que el radical HS• formado *in-situ* es el agente que ataca el anillo para formar un episulfuro (esquema 3.3).^{8,220}



Esquema 3.3. Mecanismos propuestos de formación de sulfhemo. Se ilustra la asistencia de una histidina distal frente a compuesto 0 o compuesto II. Extraído de Domán et al. (2023).⁸

Interesantemente, ha sido observado que las hemoproteínas que poseen histidina en su cavidad distal forman sulfhemo.^{186,221,307,310} Incluso, la mutación de la glutamina E7 distal por histidina en la HbI de *L. pectinata*, una proteína con alta afinidad por sulfuro, desarrolla la capacidad de formar sulfhemo, lo cual no ocurre con la variante nativa.³⁰⁷

Si bien es necesaria más experimentación para completar este estudio, la mesoMbFe^{III} parece proveer un modelo de mioglobina cuya capacidad de dar sulfhemo como reacción secundaria está atenuada.

Lo presentado en esta sección 3.4 puede ser considerado como una muestra más de la versatilidad de una proteína como la mioglobina para acceder a modelos de estudio mecanístico, ya sea por modificación del sitio activo como en nuestro caso, o bien con la estrategia de preparación de apoproteínas mutadas, ampliamente usada.

3.5 Conclusiones

Hemos realizado un estudio cinético y mecanístico de la reducción de la MbFe^{III} por HSS⁻ en condiciones anóxicas. En presencia de exceso de disulfuro se obtuvieron cursos temporales de tipo biexponencial. La funcionalidad de los mismos permite explicar la rápida formación de un complejo intermedio hexacoordinado férrico de bajo espín, seguido de una reacción

de reducción dependiente del pH, para distintas concentraciones de disulfuro en el intervalo de pH 6.6-8.0.

Estimamos constantes de velocidad para los procesos de unión y reducción ($k_{on} = 3.7 \pm 0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{red} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), a pH 7.4, 25 °C. La constante de unión es más lenta que para las especies de sulfuro. Esto puede explicarse tentativamente en términos de la migración energéticamente más costosa para la especie monoaniónica HSS^- , que es la más abundante en el intervalo de pH estudiado.²⁵³

Los experimentos de RR fueron esenciales para identificar el número de coordinación, el espín y el estado redox del hierro hémico en el complejo intermedio y en la MbFe^{II} final. El complejo férrico intermedio es espectroscópicamente similar (UV-Vis, RR) al obtenido tras la adición de sulfuro a la MbFe^{III} en las mismas condiciones. Se asigna como $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{HSS}^-)/\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{SS}^{2-})$. Significativamente, la evolución de las reacciones es diferente para los ligandos disulfuro y sulfuro, lo que indica que ni las especies de disulfuro se convirtieron en sulfuro antes de la coordinación, ni la reactividad observada estuvo influenciada por sulfuro como contaminante. De hecho, el control de síntesis de Na_2S_2 por derivatización con BzCl y ^1H RMN no presentó la señal correspondiente a sulfuro.

La reacción completa para las especies de disulfuro y MbFe^{III} es significativamente más rápida que la reacción para el sulfuro. El mecanismo de reacción propuesto se caracteriza por una reacción de coordinación seguida de una homólisis reductiva, dando lugar a MbFe^{II} . El destino de los radicales $\text{HSS}^{\bullet}/\text{SS}^{\bullet-}$ en condiciones anaerobias ha sido previsto en el esquema mecanístico, a la luz de sus propiedades termodinámicas reportadas.⁴⁷

Además, exploramos la posibilidad de generar un modelo con menor tendencia a la formación espuria de sulfhemos, especialmente con HSS^- como especie reactiva del azufre. Corroboramos que la presencia de O_2 es necesaria para que dicha reacción secundaria tenga lugar. La proteína reconstituida $\text{mesoMbFe}^{\text{III}}$ resultó menos susceptible a la formación de sulfhemo por contaminación de aire que la proteína nativa. Este modelo podría resultar de utilidad para futuros estudios del sistema.

3.6 Materiales y métodos

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza disponible, y fueron comprados a Sigma-Aldrich/Merck, salvo que se indique lo contrario. Las soluciones reguladoras de pH, las soluciones de proteínas y las soluciones de Na_2S_2 fueron preparadas de forma similar a lo descrito en la sección 2.5.1. La manipulación de las soluciones se realizó utilizando jeringas herméticas (*gas-tight*) Supelco o Hamilton. El H_2O_2 (30%, Pro-análisis ACS) fue comprado a Laboratorios Cicarelli.

Reacción de MbFe^{III} con soluciones de Na_2S_2 en condiciones anóxicas (UV-Vis)

Los experimentos se realizaron dentro del intervalo de $\text{pH } 6.6 \leq \text{pH} \leq 8.0$, en valores de pH separados por 0.2. Se mezclaron soluciones de MbFe^{III} (10^{-5} M) con alícuotas de la solución madre de Na_2S_2 (aprox. $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$), para obtener $R_{\text{SS/Fe}}$ de 10 a 100, a 25°C . Todas las soluciones se saturaron previamente con argón. La manipulación de las soluciones se realizó con jeringas *gas-tight*. La cinética de la reacción se registró mediante espectroscopia UV-vis, utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP 8453, con lámparas independientes de deuterio y tungsteno. Se utilizaron cubetas de cuarzo con tapones de rosca y septa de silicona. Las cubetas se colocaron en una cámara anóxica, con un flujo constante de argón para garantizar la ausencia de oxígeno. En esta etapa, antes de añadir la solución de sulfuro, la fuente de argón se desoxigenó burbujeándola en una trampa que contenía una solución de CrCl_2 0.2 M en H_2SO_4 0,05 M y Zn(Hg) . Para el análisis se recogieron trazas temporales a 434 nm. El tiempo total de observación para cada medición varió de 10 min a 30 min, tomando puntos cada 0.5 segundos e incrementando el intervalo temporal progresivamente.

Caracterización espectroscópica de un intermediario de reacción y de los productos mediante resonancia Raman (RR)

Los espectros RR se registraron de forma análoga a lo indicado en la sección 2.5.1. Los experimentos de RR se realizaron mezclando soluciones de MbFe^{III} (10^{-4} M) con soluciones de Na_2S_2 ($R_{\text{SS/Fe}} = 40$) utilizando jeringas *gas-tight* en cubetas de cuarzo de 3 mL, provistas de tapones de rosca con septa de silicona. Las condiciones anóxicas se mantuvieron por

ingreso constante de N_2 . Se mantuvo la agitación magnética durante toda la medición espectroscópica para evitar la degradación inducida por el láser. Se mantuvo una temperatura constante de 9 °C mediante un baño de agua circulante alfa RA8 (Lauda RA8; Lauda-Königshofen, Alemania).

Se obtuvieron registros espectroscópicos de control de las sulfmioglobinas reducidas y oxidadas para reconocer la formación no deseada de estos posibles contaminantes. Las soluciones de sulfMbFe^{II} se obtuvieron utilizando H_2O_2 y Na_2S anhidro, a pH 7.4, siguiendo un procedimiento reportado.²¹⁰

Estimación de k_{on} (régimen rápido), en condiciones de flujo detenido

Los datos cinéticos se obtuvieron registrando espectros UV-Vis resueltos en el tiempo utilizando un módulo de flujo detenido SFM-300 Bio-Logic, equipado con un espectrómetro de arreglo de diodos de alta velocidad J&M TIDAS con lámparas independientes de deuterio y tungsteno (rango de longitudes de onda de 200-1015 nm). Se utilizó el software Bio-Kine 4.50 para el registro de datos. Todas las mediciones a flujo detenido se obtuvieron a 25°C mediante un baño de agua circulante alfa RA8 (Lauda RA8; Lauda-Königshofen, Alemania). Los espectros se registraron cada 45 milisegundos promediando 3 mediciones de 15 milisegundos.

Para la estimación de la constante k_{on} de HSS^- , las soluciones saturadas de argón de los reactivos se suministraron a través de puertos anóxicos utilizando cánulas de PTFE. Las condiciones de atmósfera inerte se mantuvieron mediante un ingreso constante de argón en la cámara que contiene los émbolos automáticos de los reservorios del equipo.

El tiempo total de observación para cada medición fue de 6 s, y el tiempo muerto fue de 2 ms. La concentración de la solución madre de MbFe^{III} fue de 20 μM . Las secuencias de mezcla se realizaron de manera que la dilución final de MbFe^{III} fuera de 10 μM al momento de reaccionar con HSS^- . La concentración de las soluciones madre de Na_2S_2 se ajustó a las secuencias de mezcla conforme a las concentraciones deseadas.

Se registraron al menos cuatro corridas cinéticas para cada condición experimental, y los datos reportados correspondieron a los valores medios y las desviaciones estándar. Se siguió el decaimiento de la señal de 409 nm característica del MbFe^{III}.

Síntesis de mesoMbFe^{III}.

A partir de la MbFe^{III} comercial de corazón equino se realizó la extracción del grupo prostético original mediante un protocolo reportado para obtener la apomioglobina (apoMb).³¹³ Para ello se utilizó solución reguladora Tris:HCl 0.1M, pH = 7.1 para disolver inicialmente la MbFe^{III}. Se acidificó la solución hasta pH = 3 por agregado de HCl 1M con agitación constante en baño de hielo, para luego extraer la hemina IX con butanona. La fase acuosa fue dializada con Tris:HCl, liofilizada. El control espectroscópico por UV-Visible exige la presencia de la banda de residuos proteicos a 280 nm y la ausencia de absorción de la banda de Soret de la MbFe^{III} a 409 nm.

Para la síntesis de la mesohemina IX, se partió de mesoporfirina IX metil éster. Se quelató el precursor por medio de un procedimiento reportado.³¹⁴ Para ello se disolvió el mesoporfirina IX metil éster en dimetilformamida (DMF) previamente equilibrada con argón. Bajo atmósfera de argón, se adicionó lutidina para favorecer la desprotonación de la porfirina, y FeSO₄ sólido. La reacción se desarrolló en condiciones de reflujo bajo atmósfera de argón, con controles periódicos del avance de esta por cromatografía de capa delgada. El producto quelatado de la reacción fue extraído, secado y redisoluto en metanol. Luego se agregó un volumen equivalente de NaOH 1 M con EDTA 1 mM para saponificar los grupos éster. Se incubó la mezcla de reacción al abrigo de la luz por 4 horas. El producto, la mesohemina IX, fue extraído con CH₂Cl₂ y ácido acético, lavado y finalmente llevado a sequedad.

La reconstitución de la apoMb con mesohemina IX para obtener mesoMbFe^{III} se realizó en base a un protocolo reportado para la reconstitución con biliverdinas.³¹³ A una solución de apoMb en buffer fosfato 0.1 M, pH = 7.1, en baño de hielo, se agregó mesohemina IX en cantidades estequiométricas, disuelta previamente en un mínimo volumen de KOH 0.1 M. La reacción de reconstitución se monitoreó por espectroscopía UV-visible, por un intervalo

temporal de 1-2 horas, ya que la cinética de reconstitución involucra pasos de reordenamiento proteico que son relativamente lentos.³¹⁸ El crudo de reacción se purificó por medio de cromatografía de exclusión en gel Sephadex G-25, eluyendo con buffer fosfato 0.1 M, pH = 7.1, con control espectroscópico UV-Visible de las fracciones obtenidas. La mesoMbFe^{III} purificada se liofilizó y se almacenó a -15°C hasta su uso.

4. Carbonilación reductiva: propuesta mecanística

El CO es una molécula pequeña endógena, producida por la acción de enzimas hemo-oxigenasas durante el catabolismo del hemo, que además produce biliverdina, un pigmento tetrapirrólico que a su vez es reducido a bilirrubina por una biliverdina reductasa.³¹⁹ Además de ser los protagonistas del catabolismo del hemo, los productos de estas reacciones participan en la modulación de la función celular, dadas las propiedades antioxidantes de la biliverdina/bilirrubina y los efectos antiinflamatorios y de señalización del CO.³¹⁹

En cuanto a la posible reacción con grupos hemo como destinos bioquímicos, en contraste con el NO y el H₂S (y el HSSH), el CO es una molécula poco reactiva, específica y selectiva, observándose su interacción principalmente con hemoproteínas ferrosas.³²⁰ El diálogo químico entre ellos podría suceder sobre una plataforma hémica, como ha sido reportado en compuestos modelo¹⁷⁵ y hemoglobina.^{174,176} Como parte de este diálogo químico, los complejos férricos de la forma Fe^{III}(SH⁻) en presencia de CO son desplazados a la forma ferrosa Fe^{II}(CO). Esto da cuenta de la transferencia de carga parcial [Fe^{III}(SH⁻) ↔ Fe^{II}(SH[•])], que ya presentamos en el Capítulo 2.

Como destinos bioquímicos comunes con H₂S, CO interactúa con proteínas como la CBS y la CSE, regulando la producción de H₂S y la vasorrelajación inducida por hipoxia. Ha sido postulado que la interacción entre el CO y el H₂S podría tener importancia fisiológica a nivel de la CBS, especialmente en contextos de hipoxia.³²⁰

Este comportamiento combinado entre HS⁻ y CO no ha sido interpretado en términos de posible relevancia fisiológica, aunque hay reportes de los destinos bioquímicos del CO, sus posibles funciones y su relación con el H₂S.^{60,321,322}

En 1984 han sido reportados procesos de carbonilación reductiva en distintos compuestos hémicos férricos.¹⁷³ En el contexto de nuestro interés en la reducción del hierro hémico mediada por sulfuro y disulfuro presentada en los Capítulos 2 y 3, y de los completos estudios sobre la nitrosilación reductiva,^{170,171} los resultados publicados para la reducción de hierro hémico mediada por CO resultaron llamativos, especialmente, por la baja reactividad de CO frente a formas Fe^{III}. De hecho, los casos reportados de reducción de

hierro hémico mediada por CO mostraron, previsiblemente y en general, ser procesos muy lentos. Por ejemplo, para la hemoglobina humana y la mioglobina de cachalote, se informaron tiempos característicos para la reducción de 1000 y 800 h, respectivamente.¹⁷³ El conjunto completo de datos incluye hemoproteínas y compuestos hemo modelo. En el mismo trabajo, el caso más desarrollado es el de la reducción de hemina IX libre por exceso de CO en condiciones fuertemente alcalinas. El ejemplo fue estudiado para contribuir al estudio de la autorreducción de la enzima citocromo c oxidasa, mediada por CO. Para el caso de la hemina IX, los autores presentaron espectros UV-Vis, datos cinéticos, caracterización y cuantificación de productos finales.¹⁷³ Interesantemente, los perfiles cinéticos presentados son sigmoideos, en forma análoga a los obtenidos para la reacción autocatalítica de MbFe^{III} de reducción mediada por H₂S, por lo que en un análisis superficial e inicial del problema propusimos un mecanismo autocatalítico.

4.1 Análisis de la carbonilación reductiva de hemina IX (HIXFe^{III}) en medio alcalino

Los espectros reportados para la reacción entre hemina IX (HIXFe^{III}) y CO en medio alcalino muestran solo la región de las bandas Q. De la leyenda de los registros mostrados (figura 4.1) se infiere el descenso de la absorción de la solución original a $\lambda > 600$ nm y la aparición de dos bandas centradas en 540 y 576 nm, que corresponderían al espectro de HIXFe^{II}(CO).³²³ Esta conversión presenta puntos isobésticos a 506 y 584 nm.

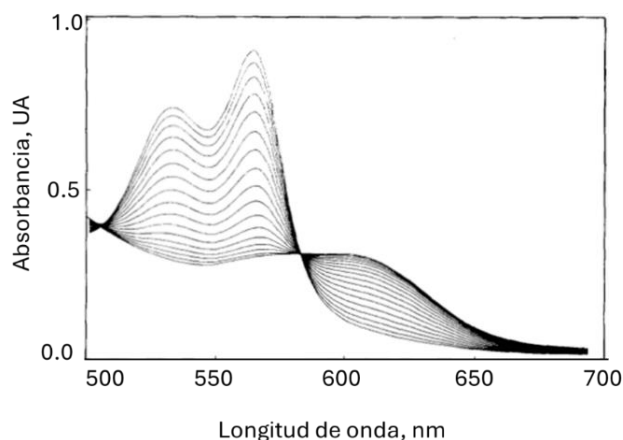


Figura 4.1. Cambios espectroscópicos UV-Vis para la reacción entre CO y hemina IX en KOH 0.1 M, T=25°C. Extraído de Bickar et al. (1984)¹⁷³

La banda de absorción a $\lambda > 600$ nm fue empleada para especular sobre la presentación de la hemina IX en la solución de partida. Esta banda es característica de la presencia de dímeros.³²⁴ Las heminas en condiciones alcalinas podrían formar dos tipos de dímeros: π - π o μ -oxo (figura 4.2).

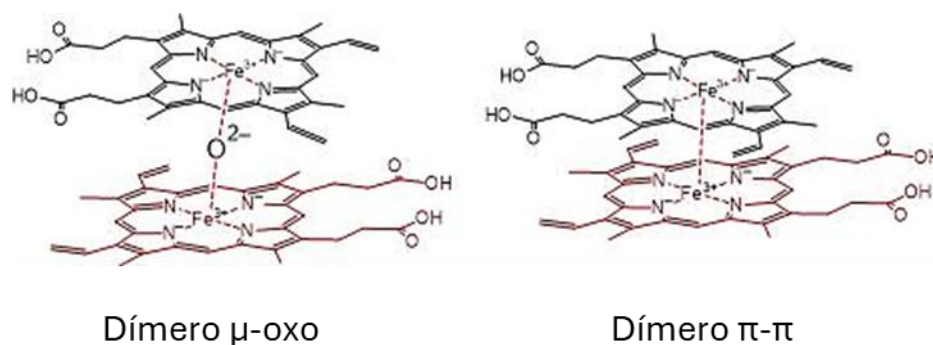


Figura 4.2. Estructuras de dímero μ -oxo (izquierda) y dímero π - π de HIXFe^{III} (derecha).

En este caso consideramos que se trataría de dímeros π - π , cuyo máximo de absorbancia se encuentra en 605 nm, a diferencia de las bandas que presentan los dímeros μ -oxo en 575 nm y 600 nm como hombro de la anterior. Los dímeros π - π se estabilizan por interacciones no covalentes de apilamiento π - π (*stacking*) y existen incluso a muy bajas concentraciones. Sumado a esto, el medio fuertemente alcalino desplaza el sistema hacia el dímero coordinado a dos ligandos OH⁻.³²⁴

En favor de la presencia de un dímero π - π en el material de partida, los autores proponen que los dímeros por interacciones μ -oxo se forman en las soluciones envejecidas, y que en esas condiciones no se observa la carbonilación reductiva. Los equilibrios participantes, con sus constantes reportadas por otros autores,³²⁴ se presentan en la figura 4.3.

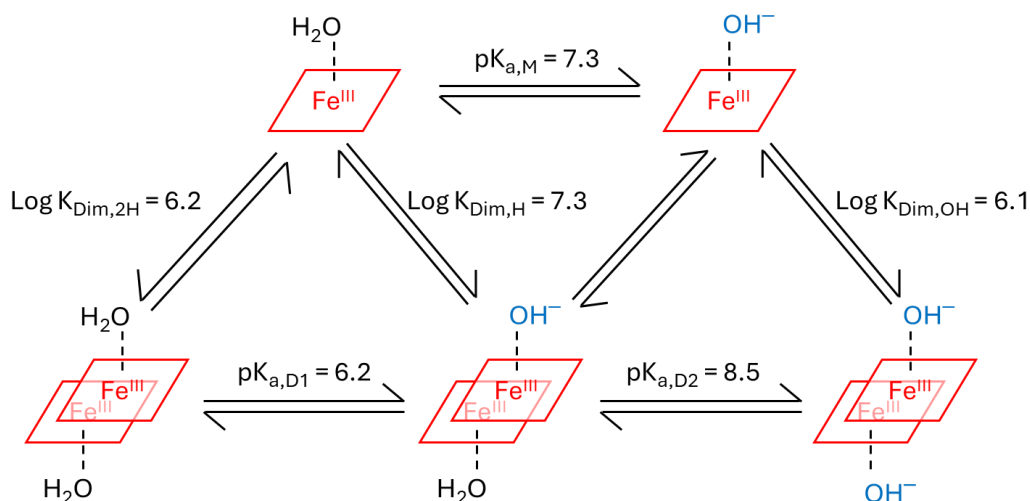


Figura 4.3. Equilibrios de dimerización y desprotonación de $\text{HIXFe}^{\text{III}}$ en medio acuoso. Adaptado de De Villiers et al. (2007).³²⁴

En base a lo presentado, para el análisis de la cinética tomamos como punto de partida el dímero π - π , bis hidroxido, $(\text{OH}^-)\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}^-)$ de la hemina IX.

Además de esta información extraída de la espectroscopía UV-Vis, el trabajo reporta la formación de CO_2 observada por análisis de espectrometría de masa (MS) de la fase gaseosa en equilibrio con las soluciones, además de la observación espectroscópica del producto de carbonilación reductiva, $\text{HIXFe}^{\text{II}}(\text{CO})$.

Cinética sigmoidea de la reducción asistida por CO: hipótesis de autocatálisis.

Por medio del software de procesamiento digital de imagen de dominio público llamado ImageJ, extrajimos los datos de grado de avance de la reacción en función del tiempo presentados para la reducción de $\text{HIXFe}^{\text{III}}$ en presencia de CO en medio alcalino.¹⁷³ Realizamos un análisis funcional de los datos y obtuvimos parámetros cinéticos. La reacción reportada fue realizada por agregado de CO en condiciones anóxicas, variando la concentración de KOH del medio desde 0.05 M hasta 1 M (figura 4.4).

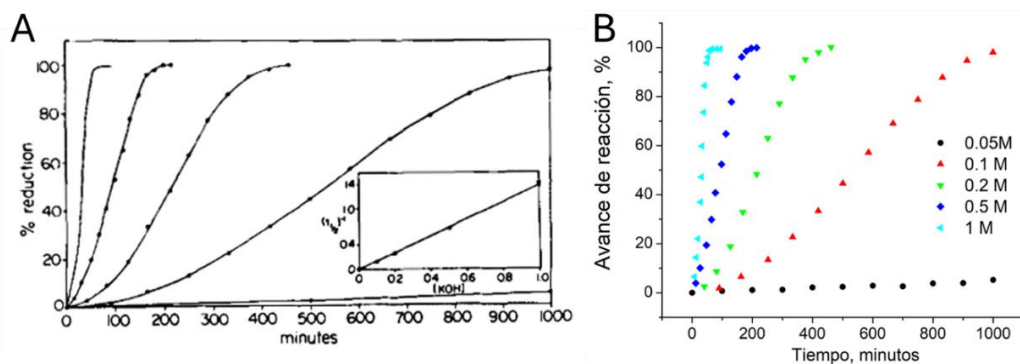


Figura 4.4. Trazas cinéticas originales (A) y reconstruidas (B) para la reacción entre CO y hemina IX, bajo atmósfera de CO (1 atm, $[CO] = 9.7 \text{ mM}$), $T=25^\circ\text{C}$, $[KOH] = 0.05 \text{ M}$ (negro), 0.1 M (rojo), 0.2 M (verde), 0.5 M (azul), 1 M (celeste). El eje y representa el porcentaje de avance de la reacción a partir de las medidas espectroscópicas. Datos extraídos de Bickar et al. (1987).¹⁷³

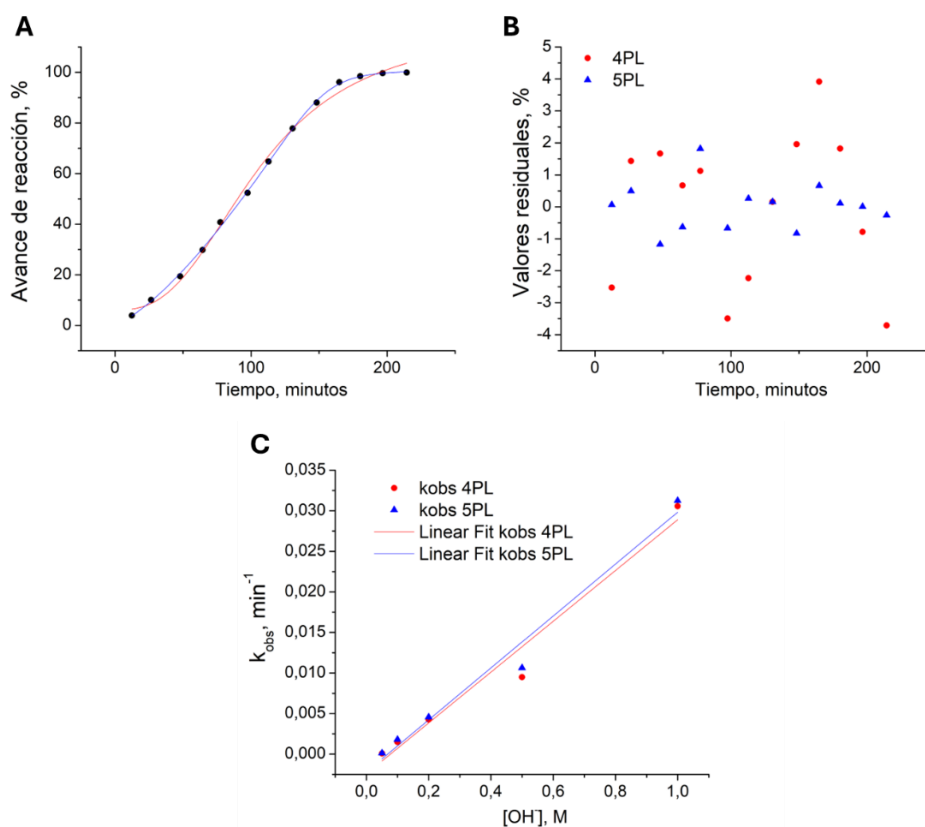


Figura 4.5. Reacción de reducción de Hemina IX asistida por CO en medio alcalino. A) Traza cinética de grado de avance de la reacción con $[KOH] = 0.5 \text{ M}$; datos experimentales en puntos negros, ajuste 4PL en rojo, ajuste 5PL en azul. B) Valores residuales de los ajustes 4PL (rojo), y 5PL (azul). C) Regresión lineal de la relación entre k_{obs} calculada para 4PL (rojo) y 5PL (azul).

A excepción de la traza con KOH menos concentrado (0.05 M), en general se observan perfiles cinéticos sigmoideos, con cierta asimetría. Analizamos individualmente las trazas cinéticas con funciones 4PL y 5PL para evaluar la calidad de ambos ajustes funcionales. De los tiempos característicos de los ajustes logísticos tomamos la recíproca como k_{obs} .

En la figura 4.5 presentamos una traza representativa ($[KOH] = 0.5 \text{ M}$) y sus residuos de ajuste, junto con la dependencia de las k_{obs} en función de $[KOH]$.

Tanto en el panel A como en el panel B se aprecia que la función 5PL ajusta significativamente mejor a los datos experimentales, que presentan asimetría en la forma de la curva. Los valores residuales son significativamente menores para la función 5PL. No obstante, la dependencia que observamos entre los valores de k_{obs} y la concentración de KOH (figura 4.5, panel C) siguen una tendencia lineal para ambos tipos de ajuste, con un valor de la pendiente de 0.031 ± 0.003 y $0.032 \pm 0.003 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para los valores de k_{obs} obtenidos por 4PL o 5PL respectivamente. Concluimos que este fenómeno puede ser modelado razonablemente con la función 4PL. En la interpretación química del proceso, esto significaría que no participan necesariamente mecanismos paralelos de terminación.

4.2 Análisis y simulación de propuestas mecanísticas de reducción de HIXFe^{III} asistida por CO

Análisis estequiométrico y de productos finales

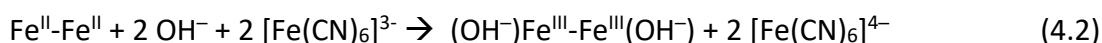
En el trabajo en estudio han descripto la estequiometría del paso de reducción en base a la reacción entre CO y citocromo c oxidasa en su forma oxidada, con Cu^{II} y Fe^{III} .



Se observa la reducción de los dos centros metálicos (reacción 4.1), con un $\Delta G^\circ = -36 \text{ kcal/mol}$.¹⁷³ Los autores proponen que la reducción de los centros metálicos está directamente acoplada a la oxidación de CO a CO_2 . Más aún, sostienen que la reacción no requiere O_2 como oxidante del CO, sino que los oxidantes son los metales; también muestran que la carbonilación reductiva puede ocurrir en HbFe^{III} y MbFe^{III} . Finalmente, estudian esta reacción en la $\text{HIXFe}^{\text{III}}$ libre en medio alcalino.¹⁷³

En el caso de la $\text{HIXFe}^{\text{III}}$ en medio alcalino anóxico, la formación de un dímero π - π y permite la interacción entre los dos centros metálicos, asemejándose al centro bimetalico de la CcO .

El CO_2 generado fue medido por MS, luego de acidificar el medio. La cuantificación realizada por los autores obedece a la estequiometría de la reacción 4.1. El agregado de oxidantes adicionales como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ que reoxida al centro metálico del hemo (reacción 4.2) aumenta la producción de CO_2 de acuerdo con la estequiometría, corroborando la relación estequiométrica planteada.

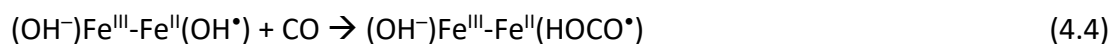


Dada la selectividad de CO por Fe^{II} , este ligando no es candidato para coordinarse al dímero férrico de partida. No obstante, el hidroxicomplejo podría ser descrito como un complejo con transferencia de carga (reacción 4.3), análogo al que se propone para sulfuro, en este caso con hidroxilo.

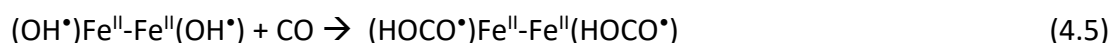


Además, en la literatura ha sido descrito un radical que puede formarse como producto de la combinación del radical $\text{OH}^\bullet$ y CO , el radical hidroxiformilo $\text{HOCO}^\bullet$ (reacción 4.4).³²⁵⁻

³²⁷ Su inclusión como parte del mecanismo permite compatibilizar la propuesta mecanística de reducción asistida por CO con la selectividad que este tiene por Fe^{II} . En el caso del dímero $\pi\pi$ de hemina IX en medio alcalino, proponemos que esto sucede en uno de los dos centros del dímero, iniciando la reacción.



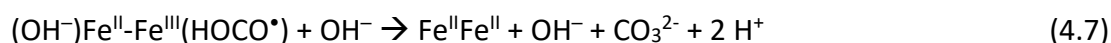
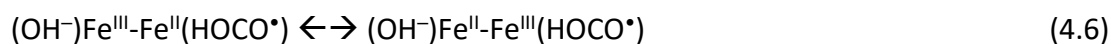
Podemos considerar que en una primera instancia uno de los iones de Fe del complejo bimetalico ha sido reducido y el carbono del ligando $\text{HOCO}^\bullet$ ha sido oxidado a estado +3. De la misma forma, la entrada de un segundo equivalente de CO por la cara contraria del dímero podría formar un segundo radical $\text{HOCO}^\bullet$ (reacción 4.5).



Sin embargo, esta hipótesis no permitiría explicar por qué el producto final de la reacción redox es carbonato, con el C en estado de oxidación +4, ya que luego de formar dos radicales

HOCO•, el dímero no tendría más aceptores de electrones y tendría dos ligandos con carbono +3. Además, la presencia de puntos isobésticos en la cinética observada predice que el dímero se convierte en producto final HIXFe^{II}(CO), o bien podría haber un intermediario sumamente reactivo, tal que su concentración estacionaria no fuese significativa.

Como alternativa parece razonable proponer una transferencia electrónica interna entre los centros metálicos del dímero, y una segunda reacción redox por un electrón que termine oxidando al carbono del radical HOCO• (reacciones 4.6 y 4.7).



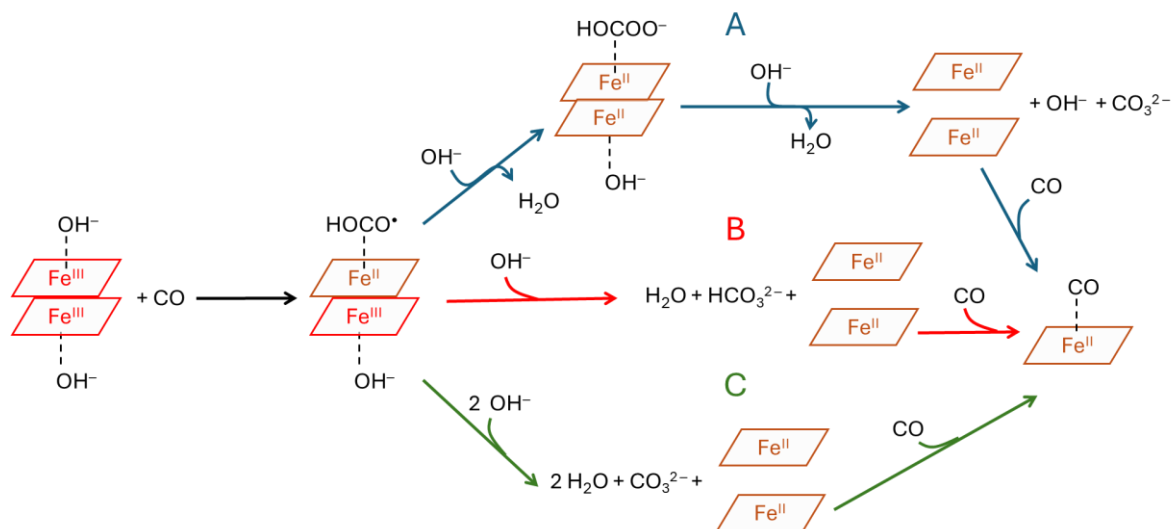
En estas condiciones, es posible que el dímero se separe en presencia de CO, que en los experimentos reportados se encuentra en exceso. De hecho, el espectro reportado para producto final se corresponde con el producto de carbonilación reductiva, HIXFe^{II}(CO) como monómero.

No ha sido observada la formación de H₂O₂ por recombinación de radicales OH•. Esto sugiere que no se liberan al medio este tipo de especies radicalarias, a partir de la homólisis del hidroxicomplejo (reacciones 4.8 y 4.9).



Propuestas mecanísticas y evaluación de la dependencia con la concentración de OH⁻

En base al análisis de los datos experimentales del trabajo publicado, y de las consideraciones del apartado anterior, construimos modelos que fueron evaluados con el software COPASI. Simulamos de forma conjunta las trazas de formación del producto Fe^{II}(CO), para cada concentración de OH⁻ (esquema 4.1).



Esquema 4.1. Modelos mecánicos para la reacción entre $(\text{OH}^-)\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH}^-)$. Se distinguen tres modelos distintos A (azul), B (rojo) y C (verde). El primer paso en flecha negra es común a los tres mecanismos.

Los pasos del esquema 4.1 constituyen pasos elementales del mecanismo. Las simulaciones de la formación del producto $\text{HIXFe}^{\text{II}}(\text{CO})$ en función del tiempo y variando la concentración de base, se muestran en la figura 4.6.

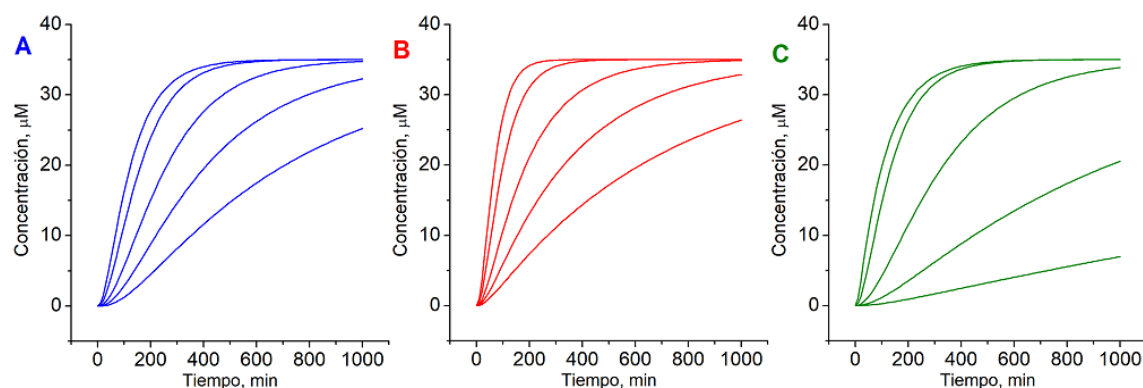
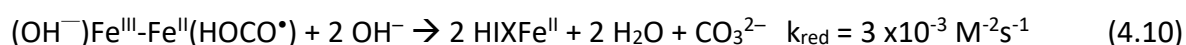


Figura 4.6. Simulación en COPASI de la concentración de $\text{HIXFe}^{\text{II}}(\text{CO})$ en función del tiempo. Modelos A (azul), B (rojo) y C (verde).

Como se observa, de los tres mecanismos el que mejor reproduce el comportamiento de los datos experimentales es el mecanismo C. A diferencia de los otros, dicho mecanismo produce muy lentamente el producto final a la concentración de OH^- más baja (0.01 M). No

ocurre lo mismo en los otros modelos, en los cuales la fuerte dependencia de la velocidad del proceso con la concentración de OH^- no se pone de manifiesto. Los mecanismos con pasos de reacción de primer orden respecto de $[\text{OH}^-]$ no reproducen la tendencia observada experimentalmente.

Lo que distingue al modelo C es el paso elemental que involucra dos equivalentes de OH^- (reacción 4.10), haciendo que la formación de HIXFe^{II} resulte de segundo orden respecto de $[\text{OH}^-]$. Los pasos elementales del mecanismo con sus constantes cinéticas se detallan a continuación.



El átomo de carbono de CO tiene que perder dos electrones para oxidarse a CO_2 , que en medio fuertemente alcalino aparece como CO_3^{2-} . El primero de ellos lo intercambia con el Fe^{III} sobre el cual se formaría el radical $\text{HOCO}^\bullet$. Como los únicos oxidantes disponibles son los iones Fe^{III} del dímero, proponemos una transferencia electrónica interna entre los átomos de Fe. Esto reoxida el Fe unido a $\text{HOCO}^\bullet$ y posibilita la transferencia del segundo electrón asistida por OH^- . La constante estimada por simulación para la reducción y separación del dímero, $k_{\text{red}} = 3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$, refleja la fuerte dependencia de la velocidad del proceso con $[\text{OH}^-]$. En este caso, la forma sigmoidea de las curvas cinéticas responde a un mecanismo de pasos consecutivos con retraso. Interesantemente, en el seguimiento cinético por espectroscopía (figura 4.1) se observan puntos isobésticos. Un análisis más detallado requeriría la observación del espectro UV-Vis completo, complementado con otras espectroscopías como IR,^{186,210–212} o Raman.^{217–219}

4.3 Conclusiones

En base a los datos experimentales disponibles propusimos un mecanismo para explicar la cinética de la reducción de hemina IX en medio alcalino asistida por CO. Es un mecanismo en pasos sucesivos, con la separación de dímeros luego de la reducción completa.

La naturaleza férrica del hidroxocomplejo dimérico de partida puede ser reinterpretada en términos de una transferencia de carga parcial, de manera análoga a los complejos con sulfuro y disulfuro. Esto explica las observaciones experimentales sobre la reducción de dichos complejos en presencia de CO.

A la luz de la diferencia en las escalas de tiempo presentadas para las hemoproteínas reportadas en el trabajo en estudio, la presencia de estructuras con dos centros metálicos permitiría encontrar mecanismos de reducción mediada por CO más rápidos (tiempos de vida media de 0.5 a 6 horas) que, en los casos de un solo centro metálico, en los que la carbonilación reductiva requiere varios días. Ciertamente, una comparación mecanística con la nitrosilación reductiva o con la reducción mediada por sulfuro o disulfuro, requeriría de más estudios sobre la carbonilación reductiva en estructuras de un único centro metálico.

Este análisis no pretende agotar el estudio de la carbonilación reductiva, únicamente busca proponer un mecanismo tentativo, que según este tratamiento de datos tendría características distintas respecto de la muy estudiada nitrosilación reductiva, y de la reducción de mioglobina férrica mediada por sulfuro y disulfuro, estudiadas en el presente trabajo de Tesis.

5. Conclusiones generales

En la presente Tesis hemos realizado aportes que avanza en la comprensión de las bases moleculares que gobiernan la reactividad de moléculas pequeñas endógenas como el sulfuro y el disulfuro frente a la mioglobina como modelo de hemoproteínas, y el monóxido de carbono frente a la hemina IX. A través de un abordaje mixto que combina análisis químicos y espectroscópicos, estudios cinéticos, y la evaluación computacional de distintas especies y procesos, hemos construido propuestas mecanísticas.

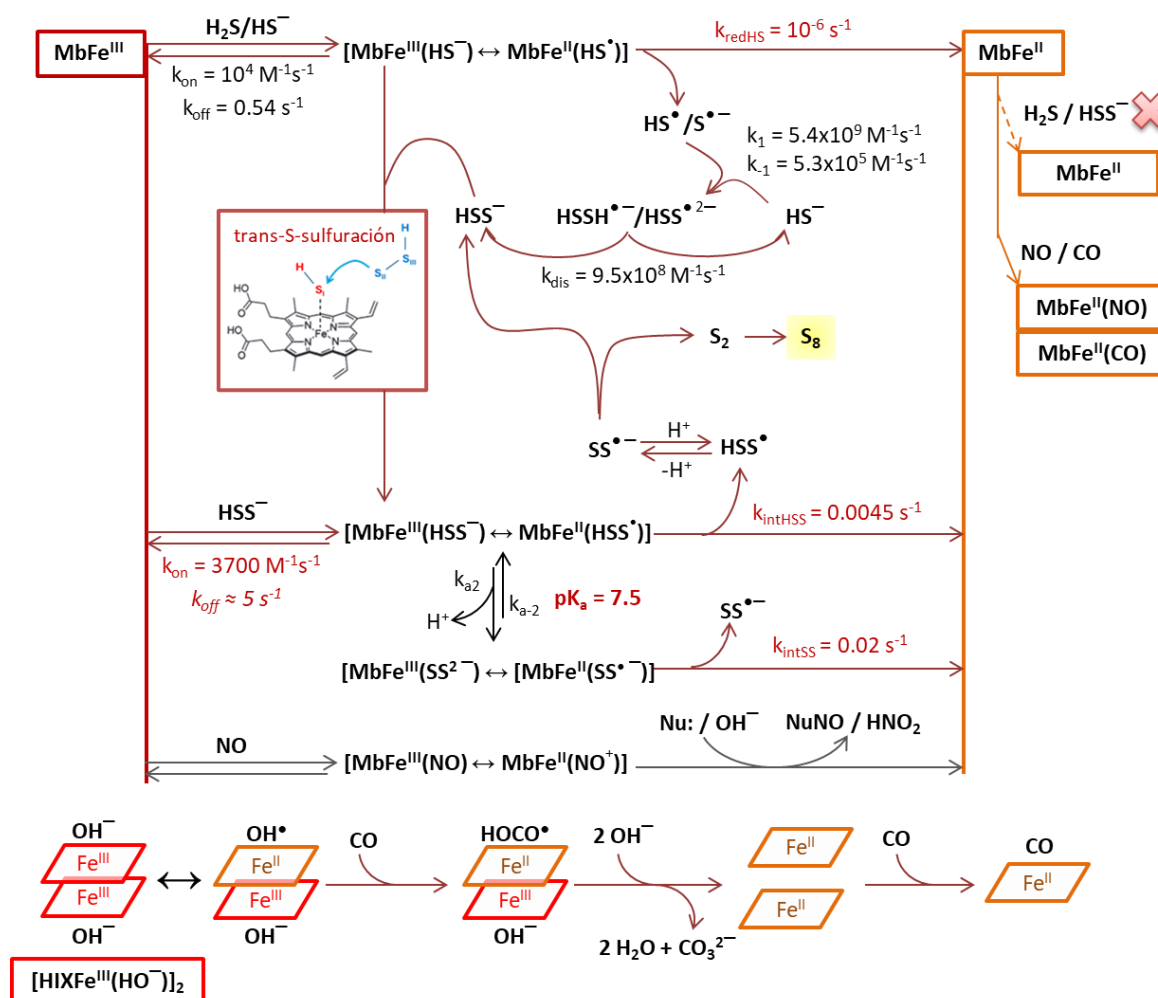
Como se menciona en la Introducción, las moléculas como sulfuro, disulfuro, monóxido de carbono y óxido nítrico, son objeto de estudio – entre otras cosas – por el interés en sus diferentes funciones bioquímicas, y a las interacciones químicas biorrelevantes que se establecen entre ellas.

Los resultados de esta Tesis permitieron avanzar en la comprensión de los mecanismos de reducción de hemoproteínas férricas mediados por sulfuro y disulfuro. En el caso del sulfuro hemos propuesto un mecanismo que permite explicar el comportamiento autocatalítico al estudiar su dependencia con la concentración de sulfuro y el pH, la estabilidad, participación y localización de distintas especies reactivas azufradas, y el diálogo químico sinérgico que se establece con disulfuro por medio de un proceso de trans-S-sulfuración sobre la plataforma hémica. En el caso del disulfuro hemos estudiado al complejo de coordinación con mioglobina férrica, abarcando su cinética de formación y reactividad redox, las características espectroscópicas y la constante de acidez. En el contexto de la interacción de estas especies reactivas del azufre con hemoproteínas, hemos explorado la formación secundaria de compuestos de adición de azufre sobre el anillo porfirínico, y evaluamos la posibilidad de generar modelos de hemoproteína menos proclives a su formación.

Por otro lado, hemos realizado un análisis de la carbonilación reductiva de hemina IX, en base a datos experimentales reportados. Propusimos un mecanismo de reacción, y lo presentamos frente a los mecanismos de reducción de hierro hémico mediados por sulfuro, disulfuro y óxido nítrico con fines comparativos, y también con la intención de presentar un primer mapa de reactividad de esta familia de moléculas frente a hierro hémico en ausencia

de oxígeno. En este punto señalamos como perspectiva la necesidad de más información experimental respecto de la reactividad de monóxido de carbono en hemoproteínas de uno o dos centros metálicos.

El esquema 5.1 resume brevemente nuestras propuestas mecanísticas, en diálogo con los aportes presentes en la literatura.



Esquema 5.1. Resumen gráfico de procesos reactivos entre MbFe^{III} o HIXFe^{III} y las moléculas de interés. Los valores de constantes cinéticas y termodinámicas determinados en el curso de la presente Tesis se presentan en rojo. El mecanismo general de nitrosilación reductiva reportado por otros se presenta en gris.

Podríamos señalar distintos aspectos como perspectivas, por ejemplo: la química analítica para reconocimiento de productos finales azufrados (polisulfuros), el estudio del diálogo

químico entre estas especies reactivas en plataformas hémicas, el estudio mecanístico de la formación de sulfhemos, las descripciones teóricas mediante herramientas computacionales de mayor complejidad. Aunque hemos logrado contribuciones a la descripción molecular de este mapa reactivo, esta Tesis no agota la descripción de los procesos reactivos mediados por estas moléculas gaseosas, endógenas y de relevancia biológica.

6. Publicaciones

Durante la presente Tesis, he tenido la oportunidad de colaborar con distintos grados de participación en la publicación de los siguientes artículos:

(1) 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. *Antioxidants & Redox Signaling* **2019**, ars.2019.7878.

<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7878>.

(2) **Palermo, J. C.***; Córdova, J. A.*; Semelak, J. A.; Capece, L.; Bari, S. E.; Estrin, D. A. Computational Evaluation of Relevant Species in Inorganic Sulfur Biochemistry. *Electron. Struct.* **2022**, 4 (4), 044006.

<https://doi.org/10.1088/2516-1075/aca945>.

(3) **Palermo, J. C.**; Colombo, M. C.; Scocozza, M. F.; Murgida, D. H.; Estrin, D. A.; Bari, S. E. Reduction of Metmyoglobin by Inorganic Disulfide Species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, 245, 112256.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112256>.

(4) **Palermo, J. C.**; Carlini Colombo, M.; Semelak, J. A.; Scocozza, M. F.; Boubeta, F. M.; Murgida, D. H.; Estrin, D. A.; Bari, S. E. Autocatalytic Mechanism in the Anaerobic Reduction of Metmyoglobin by Sulfide Species. *Inorg. Chem.* **2023**, 62 (29), 11304–11317.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c00593>.

(5) Córdova, J. A.*; **Palermo, J. C.***; Estrin, D. A.; Bari, S. E.; Capece, L. Binding Mechanism of Disulfide Species to Ferric Hemeproteins: The Case of Metmyoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, 247, 112313.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112313>.

* En los trabajos (2) y (5), los dos primeros autores contribuyeron en forma equivalente.

El artículo (1) es un trabajo de revisión que reúne antecedentes de reactividad entre sulfuro y distintas hemoproteínas, que aparecen en el Capítulo introductorio, sección 1.4. Parte de lo abordado en el artículo (2) contribuyó a la descripción molecular de RSS inorgánicas; en particular presentamos aquí la discusión sobre constantes de acidez de HSSH y HS[•] (sección 2.2.1), y la estabilidad de HSSH^{•-}/ HSSH^{•2-} (sección 2.2.2). El artículo (4) contiene la mayor parte de los resultados presentados en el Capítulo 2. Los artículos (3) y (5) contienen la mayor parte de los resultados presentados en el Capítulo 3.

7. Referencias

- (1) Sasselov, D. D.; Grotzinger, J. P.; Sutherland, J. D. The Origin of Life as a Planetary Phenomenon. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (6), eaax3419. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3419>.
- (2) Weiss, M. C.; Sousa, F. L.; Mrnjavac, N.; Neukirchen, S.; Roettger, M.; Nelson-Sathi, S.; Martin, W. F. The Physiology and Habitat of the Last Universal Common Ancestor. *Nat Microbiol* **2016**, *1* (9), 16116. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116>.
- (3) Wacey, D.; Kilburn, M. R.; Saunders, M.; Cliff, J.; Brasier, M. D. Microfossils of Sulphur-Metabolizing Cells in 3.4-Billion-Year-Old Rocks of Western Australia. *Nature Geosci* **2011**, *4* (10), 698–702. <https://doi.org/10.1038/ngeo1238>.
- (4) Olson, K. R. Reactive Oxygen Species or Reactive Sulfur Species: Why We Should Consider the Latter. *Journal of Experimental Biology* **2020**, *223* (4), jeb196352. <https://doi.org/10.1242/jeb.196352>.
- (5) Shriver & Atkins' *Inorganic Chemistry*, 5th ed.; Atkins, P. W., Ed.; Oxford University Press: Oxford ; New York, 2010.
- (6) Giles, G. I.; Jacob, C. Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biological Chemistry* **2002**, *383* (3–4). <https://doi.org/10.1515/BC.2002.042>.
- (7) Nagy, P. Recent Advances in Sulfur Biology and Chemistry. *Redox Biology* **2023**, *63*, 102716. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102716>.
- (8) Domán, A.; Dóka, É.; Garai, D.; Bogdándi, V.; Balla, G.; Balla, J.; Nagy, P. Interactions of Reactive Sulfur Species with Metalloproteins. *Redox Biology* **2023**, *60*, 102617. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102617>.
- (9) 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. *Antioxidants & Redox Signaling* **2019**, ars.2019.7878. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7878>.
- (10) Kimura, H. Hydrogen Sulfide (H₂S) and Polysulfide (H₂Sn) Signaling: The First 25 Years. *Biomolecules* **2021**, *11* (6), 896. <https://doi.org/10.3390/biom11060896>.
- (11) Khodade, V. S.; Toscano, J. P. Reactive Sulfur Species in Biology and Medicine. *Antioxidants* **2023**, *12* (9), 1759. <https://doi.org/10.3390/antiox12091759>.
- (12) Vignane, T.; Filipovic, M. R. Emerging Chemical Biology of Protein Persulfidation. *Antioxidants & Redox Signaling* **2023**, *39* (1–3), 19–39. <https://doi.org/10.1089/ars.2023.0352>.
- (13) Mishanina, T. V.; Libiad, M.; Banerjee, R. Biogenesis of Reactive Sulfur Species for Signaling by Hydrogen Sulfide Oxidation Pathways. *Nature Chemical Biology* **2015**, *11* (7), 457–464. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1834>.
- (14) 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. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295* (46), 15466–15481. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014728>.
- (15) Trujillo, M.; Alvarez, B.; Radi, R. One- and Two-Electron Oxidation of Thiols: Mechanisms, Kinetics and Biological Fates. *Free Radical Research* **2016**, *50* (2), 150–171. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1089988>.
- (16) Vašková, J.; Kočan, L.; Vaško, L.; Perjési, P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1447. <https://doi.org/10.3390/molecules28031447>.
- (17) Filipovic, M. R.; Zivanovic, J.; Alvarez, B.; Banerjee, R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews* **2018**, *118* (3), 1253–1337. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>.

- (18) Gruhlke, M. C. H.; Slusarenko, A. J. The Biology of Reactive Sulfur Species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry* **2012**, *59*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.03.016>.
- (19) Giles, G.; Nasim, M.; Ali, W.; Jacob, C. The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants* **2017**, *6* (2), 38. <https://doi.org/10.3390/antiox6020038>.
- (20) Lau, N.; Pluth, M. D. Reactive Sulfur Species (RSS): Persulfides, Polysulfides, Potential, and Problems. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *49*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.08.012>.
- (21) Bhattacharjee, A.; Matsuda, Y.; Fujii, A.; Wategaonkar, S. The Intermolecular S $\cdots$ H $\cdots$ Y (Y=S,O) Hydrogen Bond in the H₂S Dimer and the H₂S–MeOH Complex. *ChemPhysChem* **2013**, *14* (5), 905–914. <https://doi.org/10.1002/cphc.201201012>.
- (22) Hughes, M. N.; Centelles, M. N.; Moore, K. P. Making and Working with Hydrogen Sulfide. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, *47* (10), 1346–1353. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.018>.
- (23) Li, Q.; Lancaster, J. R. Chemical Foundations of Hydrogen Sulfide Biology. *Nitric Oxide* **2013**, *35*, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.001>.
- (24) Loy, H. L.; Himmelblau, D. M. THE FIRST IONIZATION CONSTANT OF HYDROGEN SULFIDE IN WATER. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65* (2), 264–267. <https://doi.org/10.1021/j100820a019>.
- (25) Kubli, H. 249. Die Dissoziation von Schwefelwasserstoff. *Helvetica Chimica Acta* **1946**, *29* (6), 1962–1973. <https://doi.org/10.1002/hlca.19460290670>.
- (26) Su, Y.; Cheng, K.; Jean, Y. Amplified Potentiometric Determination of p, p, p, and p of Hydrogen Sulfides with AgS ISE. *Talanta* **1997**, *44* (10), 1757–1763. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00045-3).
- (27) Bruner, L.; Zawadzki, J. Über Die Gleichgewichte Bei Der Schwefelwasserstofffällung Der Metalle. *Z. Anorg. Chem.* **1910**, *65* (1), 136–151. <https://doi.org/10.1002/zaac.19090650113>.
- (28) Ellis, A. J.; Golding, R. M. 25. Spectrophotometric Determination of the Acid Dissociation Constants of Hydrogen Sulphide. *J. Chem. Soc.* **1959**, 127. <https://doi.org/10.1039/jr9590000127>.
- (29) Ellis, A. J.; Giggenbach, W. Hydrogen Sulphide Ionization and Sulphur Hydrolysis in High Temperature Solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1971**, *35* (3), 247–260. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(71\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(71)90036-6).
- (30) Konopik, N.; Leberl, O. Dissoziationskonstanten sehr schwacher Säuren: Kolorimetrische pH-Bestimmung im Bereich 10 bis 15. III. Mitteilung. *Monatshefte für Chemie* **1949**, *80* (5), 655–669. <https://doi.org/10.1007/BF00898857>.
- (31) Goldhaber, M. B.; Kaplan, I. R. Apparent Dissociation Constants of Hydrogen Sulfide in Chloride Solutions. *Marine Chemistry* **1975**, *3* (2), 83–104. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(75\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(75)90016-X).
- (32) Wright, R. H.; Maass, O. THE SOLUBILITY OF HYDROGEN SULPHIDE IN WATER FROM THE VAPOR PRESSURES OF THE SOLUTIONS. *Can. J. Res.* **1932**, *6* (1), 94–101. <https://doi.org/10.1139/cjr32-006>.
- (33) Kaputinskii, A. F. Solubility Product and the Solubility of Metal Sulphides in Water. *CR Dokl. Akad. Sci. USSR* **1940**.
- (34) Steudel, R.; Chivers, T. The Role of Polysulfide Dianions and Radical Anions in the Chemical, Physical and Biological Sciences, Including Sulfur-Based Batteries. *Chemical Society Reviews* **2019**, *48* (12), 3279–3319. <https://doi.org/10.1039/C8CS00826D>.
- (35) Giggenbach, W. Optical Spectra and Equilibrium Distribution of Polysulfide Ions in Aqueous Solution at 20.Deg. *Inorganic Chemistry* **1972**, *11* (6), 1201–1207. <https://doi.org/10.1021/ic50112a009>.

- (36) Meyer, B.; Ward, K.; Koshlap, K.; Peter, L. Second Dissociation Constant of Hydrogen Sulfide. *Inorg. Chem.* **1983**, 22 (16), 2345–2346. <https://doi.org/10.1021/ic00158a027>.
- (37) Myers, R. J. The New Low Value for the Second Dissociation Constant for H₂S: Its History, Its Best Value, and Its Impact on the Teaching of Sulfide Equilibria. *J. Chem. Educ.* **1986**, 63 (8), 687. <https://doi.org/10.1021/ed063p687>.
- (38) Schoonen, M. A. A.; Barnes, H. L. An Approximation of the Second Dissociation Constant for H₂S. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1988**, 52 (3), 649–654. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90326-2).
- (39) Peramunage, Dharmasena.; Forouzan, Fardad.; Licht, Stuart. Activity and Spectroscopic Analysis of Concentrated Solutions of Potassium Sulfide. *Anal. Chem.* **1994**, 66 (3), 378–383. <https://doi.org/10.1021/ac00075a011>.
- (40) Licht, Stuart.; Forouzan, Fardad.; Longo, Kevin. Differential Densometric Analysis of Equilibria in Highly Concentrated Media: Determination of the Aqueous Second Acid Dissociation Constant of H₂S. *Anal. Chem.* **1990**, 62 (13), 1356–1360. <https://doi.org/10.1021/ac00212a030>.
- (41) Knox, J. A Study of the Sulphur Anion and of Complex Sulphur Anions. *Trans. Faraday Soc.* **1908**, 4 (June), 29. <https://doi.org/10.1039/tf9080400029>.
- (42) Widmer, M.; Schwarzenbach, G. Die Acidität Des Hydrogensulfidions HS⁻. *Helvetica Chimica Acta* **1964**, 47 (1), 266–271. <https://doi.org/10.1002/hlca.19640470135>.
- (43) Ellis, A. J.; Milestone, N. B. The Ionization Constants of Hydrogen Sulphide from 20 to 90°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1967**, 31 (4), 615–620. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(67\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(67)90038-5).
- (44) Maronny, G. Constantes de dissociation de l'hydrogène sulfuré. *Electrochimica Acta* **1959**, 1 (1), 58–69. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(59\)80009-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(59)80009-8).
- (45) DRZAIC, P. S.; MARKS, J.; BRAUMAN, J. I. Electron Photodetachment from Gas Phase Molecular Anions. In *Ions and Light*; Elsevier, 1984; pp 167–211.
- (46) Rickard, D.; Luther, G. W. Chemistry of Iron Sulfides. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (2), 514–562. <https://doi.org/10.1021/cr0503658>.
- (47) Koppenol, W. H.; Bounds, P. L. Signaling by Sulfur-Containing Molecules. Quantitative Aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2017**, 617, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.012>.
- (48) Armstrong, D. A.; Huie, R. E.; Koppenol, W. H.; Lyman, S. V.; Merényi, G.; Neta, P.; Ruscic, B.; Stanbury, D. M.; Steenken, S.; Wardman, P. Standard Electrode Potentials Involving Radicals in Aqueous Solution: Inorganic Radicals (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2015**, 87 (11–12), 1139–1150. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-0502>.
- (49) Hoffmann, M. R. Kinetics and Mechanism of Oxidation of Hydrogen Sulfide by Hydrogen Peroxide in Acidic Solution. *Environ. Sci. Technol.* **1977**, 11 (1), 61–66. <https://doi.org/10.1021/es60124a004>.
- (50) Das, T. N.; Huie, R. E.; Neta, P.; Padmaja, S. Reduction Potential of the Sulfhydryl Radical: Pulse Radiolysis and Laser Flash Photolysis Studies of the Formation and Reactions of ·SH and HSSH·⁻ in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, 103 (27), 5221–5226. <https://doi.org/10.1021/jp9907544>.
- (51) Sun, J.; Stanbury, D. M. Trace Metal-Ion Catalysis of Oxidation of Aqueous Hydrogen Sulfide by Outer-Sphere Oxidants. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, 336, 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(02\)00876-9](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(02)00876-9).
- (52) Szabo, C. A Timeline of Hydrogen Sulfide (H₂S) Research: From Environmental Toxin to Biological Mediator. *Biochemical Pharmacology* **2018**, 149, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>.

- (53) Nicholls, P.; Marshall, D. C.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. Sulfide Inhibition of and Metabolism by Cytochrome c Oxidase. *Biochemical Society Transactions* **2013**, *41* (5), 1312–1316. <https://doi.org/10.1042/BST20130070>.
- (54) Hill, B. C.; Woon, T. C.; Nicholls, P.; Peterson, J.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. Interactions of Sulphide and Other Ligands with Cytochrome c Oxidase. An Electron-Paramagnetic-Resonance Study. *Biochemical Journal* **1984**, *224* (2), 591–600. <https://doi.org/10.1042/bj2240591>.
- (55) Pietri, R.; Lewis, A.; León, R. G.; Casabona, G.; Kiger, L.; Yeh, S.-R.; Fernandez-Alberti, S.; Marden, M. C.; Cadilla, C. L.; López-Garriga, J. Factors Controlling the Reactivity of Hydrogen Sulfide with Hemeproteins. *Biochemistry* **2009**, *48* (22), 4881–4894. <https://doi.org/10.1021/bi801738j>.
- (56) Vo, T. T. T.; Huynh, T. D.; Wang, C.-S.; Lai, K.-H.; Lin, Z.-C.; Lin, W.-N.; Chen, Y.-L.; Peng, T.-Y.; Wu, H.-C.; Lee, I.-T. The Potential Implications of Hydrogen Sulfide in Aging and Age-Related Diseases through the Lens of Mitohormesis. *Antioxidants* **2022**, *11* (8), 1619. <https://doi.org/10.3390/antiox11081619>.
- (57) Davinelli, S.; Bassetto, F.; Vitale, M.; Scapagnini, G. Thermal Waters and the Hormetic Effects of Hydrogen Sulfide on Inflammatory Arthritis and Wound Healing. In *The Science of Hormesis in Health and Longevity*; Elsevier, 2019; pp 121–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814253-0.00010-3>.
- (58) Malone Rubright, S. L.; Pearce, L. L.; Peterson, J. Environmental Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Nitric Oxide* **2017**, *71*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.011>.
- (59) Paul, B. D.; Snyder, S. H.; Kashfi, K. Effects of Hydrogen Sulfide on Mitochondrial Function and Cellular Bioenergetics. *Redox Biology* **2021**, *38*, 101772. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101772>.
- (60) Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Snyder, S. H. Signaling by Gasotransmitters. *Science Signaling* **2009**, *2* (68), re2–re2. <https://doi.org/10.1126/scisignal.268re2>.
- (61) Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. Defining Hormesis. *Hum Exp Toxicol* **2002**, *21* (2), 91–97. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht217oa>.
- (62) Calabrese, E. J.; Agathokleous, E.; Dhawan, G.; Kapoor, R.; Dhawan, V.; Manes, P. K.; Calabrese, V. Nitric Oxide and Hormesis. *Nitric Oxide* **2023**, *133*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2023.02.001>.
- (63) Olson, K. R. Hydrogen Sulfide as an Oxygen Sensor. *Antioxidants & Redox Signaling* **2015**, *22* (5), 377–397. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5930>.
- (64) Tripathi, S. J.; Chakraborty, S.; Miller, E.; Pieper, A. A.; Paul, B. D. Hydrogen Sulfide Signalling in Neurodegenerative Diseases. *British J Pharmacology* **2023**, bph.16170. <https://doi.org/10.1111/bph.16170>.
- (65) Fukuto, J. M.; Perez-Ternero, C.; Zarenkiewicz, J.; Lin, J.; Hobbs, A. J.; Toscano, J. P. Hydropersulfides (RSSH) and Nitric Oxide (NO) Signaling: Possible Effects on S-Nitrosothiols (RS-NO). *Antioxidants* **2022**, *11* (1), 169. <https://doi.org/10.3390/antiox11010169>.
- (66) Cortese-Krott, M. M.; Koning, A.; Kuhnle, G. G. C.; Nagy, P.; Bianco, C. L.; Pasch, A.; Wink, D. A.; Fukuto, J. M.; Jackson, A. A.; van Goor, H.; Olson, K. R.; Feelisch, M. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, *27* (10), 684–712. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7083>.
- (67) Liu, J.; Mesfin, F. M.; Hunter, C. E.; Olson, K. R.; Shelley, W. C.; Brokaw, J. P.; Manohar, K.; Markel, T. A. Recent Development of the Molecular and Cellular Mechanisms of Hydrogen Sulfide Gasotransmitter. *Antioxidants* **2022**, *11* (9), 1788. <https://doi.org/10.3390/antiox11091788>.

- (68) Siracusa, R.; Voltarelli, V. A.; Salinaro, A. T.; Modafferi, S.; Cuzzocrea, S.; Calabrese, E. J.; Di Paola, R.; Otterbein, L. E.; Calabrese, V. NO, CO and H₂S: A Trinacrium of Bioactive Gases in the Brain. *Biochemical Pharmacology* **2022**, *202*, 115122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115122>.
- (69) Kimura, H. Hydrogen Sulfide (H₂S)/Polysulfides (H₂Sn) Signalling and TRPA1 Channels Modification on Sulfur Metabolism. *Biomolecules* **2024**, *14* (1), 129. <https://doi.org/10.3390/biom14010129>.
- (70) Kabil, O.; Motl, N.; Banerjee, R. H₂S and Its Role in Redox Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844* (8), 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.01.002>.
- (71) Fu, M.; Zhang, W.; Wu, L.; Yang, G.; Li, H.; Wang, R. Hydrogen Sulfide (H₂S) Metabolism in Mitochondria and Its Regulatory Role in Energy Production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (8), 2943–2948. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115634109>.
- (72) Teng, H.; Wu, B.; Zhao, K.; Yang, G.; Wu, L.; Wang, R. Oxygen-Sensitive Mitochondrial Accumulation of Cystathionine β -Synthase Mediated by Lon Protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (31), 12679–12684. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308487110>.
- (73) Steiger, A. K.; Zhao, Y.; Pluth, M. D. Emerging Roles of Carbonyl Sulfide in Chemical Biology: Sulfide Transporter or Gasotransmitter? *Antioxidants & Redox Signaling* **2018**, *28* (16), 1516–1532. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7119>.
- (74) Shibuya, N.; Koike, S.; Tanaka, M.; Ishigami-Yuasa, M.; Kimura, Y.; Ogasawara, Y.; Fukui, K.; Nagahara, N.; Kimura, H. A Novel Pathway for the Production of Hydrogen Sulfide from D-Cysteine in Mammalian Cells. *Nature Communications* **2013**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2371>.
- (75) Zainol Abidin, Q. H.; Ida, T.; Morita, M.; Matsunaga, T.; Nishimura, A.; Jung, M.; Hassan, N.; Takata, T.; Ishii, I.; Kruger, W.; Wang, R.; Motohashi, H.; Tsutsui, M.; Akaike, T. Synthesis of Sulfides and Persulfides Is Not Impeded by Disruption of Three Canonical Enzymes in Sulfur Metabolism. *Antioxidants* **2023**, *12* (4), 868. <https://doi.org/10.3390/antiox12040868>.
- (76) Gubern, M.; Andriamihaja, M.; Nübel, T.; Blachier, F.; Bouillaud, F. Sulfide, the First Inorganic Substrate for Human Cells. *FASEB j.* **2007**, *21* (8), 1699–1706. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7407com>.
- (77) Benchoam, D.; Cuevasanta, E.; Möller, M.; Alvarez, B. Hydrogen Sulfide and Persulfides Oxidation by Biologically Relevant Oxidizing Species. *Antioxidants* **2019**, *8* (2), 48. <https://doi.org/10.3390/antiox8020048>.
- (78) Landry, A. P.; Ballou, D. P.; Banerjee, R. Modulation of Catalytic Promiscuity during Hydrogen Sulfide Oxidation. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (6), 1651–1658. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00258>.
- (79) Landry, A. P.; Ballou, D. P.; Banerjee, R. Hydrogen Sulfide Oxidation by Sulfide Quinone Oxidoreductase. *ChemBioChem* **2021**, *22* (6), 949–960. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000661>.
- (80) Levitt, M. D.; Abdel-Rehim, M. S.; Furne, J. Free and Acid-Labile Hydrogen Sulfide Concentrations in Mouse Tissues: Anomalously High Free Hydrogen Sulfide in Aortic Tissue. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15* (2), 373–378. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3525>.
- (81) Vitvitsky, V.; Kabil, O.; Banerjee, R. High Turnover Rates for Hydrogen Sulfide Allow for Rapid Regulation of Its Tissue Concentrations. *Antioxidants & Redox Signaling* **2012**, *17* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4310>.
- (82) Olson, K. R.; DeLeon, E. R.; Liu, F. Controversies and Conundrums in Hydrogen Sulfide Biology. *Nitric Oxide* **2014**, *41*, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.05.012>.

- (83) Peleli, M.; Zampas, P.; Papapetropoulos, A. Hydrogen Sulfide and the Kidney: Physiological Roles, Contribution to Pathophysiology, and Therapeutic Potential. *Antioxidants & Redox Signaling* **2022**, *36* (4–6), 220–243. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0014>.
- (84) Cornwell, A.; Badiei, A. From Gasotransmitter to Immunomodulator: The Emerging Role of Hydrogen Sulfide in Macrophage Biology. *Antioxidants* **2023**, *12* (4), 935. <https://doi.org/10.3390/antiox12040935>.
- (85) Huang, D.; Jing, G.; Zhu, S. Regulation of Mitochondrial Respiration by Hydrogen Sulfide. *Antioxidants* **2023**, *12* (8), 1644. <https://doi.org/10.3390/antiox12081644>.
- (86) Wallace, J. L.; Vaughan, D.; Dicay, M.; MacNaughton, W. K.; De Nucci, G. Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic. *Antioxidants & Redox Signaling* **2018**, *28* (16), 1533–1540. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7068>.
- (87) Wallace, J. L.; Wang, R. Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics: Exploiting a Unique but Ubiquitous Gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (5), 329–345. <https://doi.org/10.1038/nrd4433>.
- (88) Caliendo, G.; Cirino, G.; Santagada, V.; Wallace, J. L. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H_2S): Development of H_2S -Releasing Drugs as Pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (17), 6275–6286. <https://doi.org/10.1021/jm901638j>.
- (89) Steudel, R. Inorganic Polysulfides S_n^{2-} and Radical Anions $S_n^{\cdot-}$. In *Topic in Current Chemistry*; Steudel, R., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; Vol. 231, pp 127–152. <https://doi.org/10.1007/b13183>.
- (90) Steudel, R. Inorganic Polysulfanes H_2S_n with $n > 1$. In *Topic in Current Chemistry*; Steudel, R., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; Vol. 231, pp 99–126.
- (91) Schwarzenbach, G.; Fischer, A. Die Acidität Der Sulfane Und Die Zusammensetzung Wässriger Polysulfidlösungen. *HCA* **1960**, *43* (5), 1365–1390. <https://doi.org/10.1002/hlca.19600430521>.
- (92) Kamyshny, A.; Goifman, A.; Gun, J.; Rizkov, D.; Lev, O. Equilibrium Distribution of Polysulfide Ions in Aqueous Solutions at 25 °C: A New Approach for the Study of Polysulfides' Equilibria. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (24), 6633–6644. <https://doi.org/10.1021/es049514e>.
- (93) Gun, J.; Modestov, A. D.; Kamyshny, A.; Ryzkov, D.; Gitis, V.; Goifman, A.; Lev, O.; Hultsch, V.; Grischek, T.; Worch, E. Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aqueous Polysulfide Solutions. *Microchim. Acta* **2004**, *146* (3–4), 229–237. <https://doi.org/10.1007/s00604-004-0179-5>.
- (94) Avetisyan, K.; Kamyshny, A. Thermodynamic Constants of Formation of Disulfide Anion in Aqueous Solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2022**, *325*, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2022.02.031>.
- (95) Bogdándi, V.; Ida, T.; Sutton, T. R.; Bianco, C.; Ditrói, T.; Koster, G.; Henthorn, H. A.; Minnion, M.; Toscano, J. P.; van der Vliet, A.; Pluth, M. D.; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T.; Nagy, P. Speciation of Reactive Sulfur Species and Their Reactions with Alkylating Agents: Do We Have Any Clue about What Is Present inside the Cell?: Speciation of Reactive Sulfur Species. *British Journal of Pharmacology* **2018**. <https://doi.org/10.1111/bph.14394>.
- (96) Liu, X.; Sprik, M.; Cheng, J. Hydration, Acidity and Metal Complexing of Polysulfide Species: A First Principles Molecular Dynamics Study. *Chemical Physics Letters* **2013**, *563*, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.01.046>.
- (97) Juel, C. Muscle pH Regulation: Role of Training. *Acta Physiologica Scandinavica* **1998**, *162* (3), 359–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.0305f.x>.
- (98) Carter, N. W.; Rector, F. C.; Campion, D. S.; Seldin, D. W. Measurement of Intracellular pH of Skeletal Muscle with pH-Sensitive Glass Microelectrodes*. *J. Clin. Invest.* **1967**, *46* (6), 920–933. <https://doi.org/10.1172/JCI105598>.

- (99) Santo-Domingo, J.; Demaurex, N. The Renaissance of Mitochondrial pH. *Journal of General Physiology* **2012**, *139* (6), 415–423. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110767>.
- (100) Evans, D. F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A. G.; Dyson, T. J.; Hardcastle, J. D. Measurement of Gastrointestinal pH Profiles in Normal Ambulant Human Subjects. *Gut* **1988**, *29* (8), 1035–1041. <https://doi.org/10.1136/gut.29.8.1035>.
- (101) Steudel, R. Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, *35* (4), 1417–1423. <https://doi.org/10.1021/ie950558t>.
- (102) Tebbe, F. N.; Wasserman, E.; Peet, W. G.; Vatvars, A.; Hayman, A. C. Composition of Elemental Sulfur in Solution: Equilibrium of S₆, S₇ and S₈ at Ambient Temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (18), 4971–4972. <https://doi.org/10.1021/ja00382a050>.
- (103) Kamyshny, A. Solubility of Cyclooctasulfur in Pure Water and Sea Water at Different Temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2009**, *73* (20), 6022–6028. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.07.003>.
- (104) Steudel, R.; Eckert, B. Solid Sulfur Allotropes. In *Elemental Sulfur and Sulfur-Rich Compounds I*; Steudel, R., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; Vol. 230, pp 1–80. <https://doi.org/10.1007/b12110>.
- (105) Steudel, R. Aqueous Sulfur Sols. In *Elemental Sulfur and Sulfur-Rich Compounds I*; Steudel, R., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; Vol. 230, pp 153–166. <https://doi.org/10.1007/b12113>.
- (106) Garcia, A. A.; Druschel, G. K. Elemental Sulfur Coarsening Kinetics. *Geochem Trans* **2014**, *15* (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12932-014-0011-z>.
- (107) Cuevasanta, E.; Benchoam, D.; Semelak, J. A.; Möller, M. N.; Zeida, A.; Trujillo, M.; Alvarez, B.; Estrin, D. A. Possible Molecular Basis of the Biochemical Effects of Cysteine-Derived Persulfides. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 975988. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.975988>.
- (108) Cuevasanta, E.; Möller, M. N.; Alvarez, B. Biological Chemistry of Hydrogen Sulfide and Persulfides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2017**, *617*, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.09.018>.
- (109) Kimura, Y.; Mikami, Y.; Osumi, K.; Tsugane, M.; Oka, J.; Kimura, H. Polysulfides Are Possible H₂S-Derived Signaling Molecules in Rat Brain. *The FASEB Journal* **2013**, *27* (6), 2451–2457. <https://doi.org/10.1096/fj.12-226415>.
- (110) Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide (H₂S), Polysulfides (H₂S_n), and Other S-Sulfurated Signaling Molecules. In *Sulfurtransferases*; Elsevier, 2023; pp 83–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18827-5.00011-X>.
- (111) Nagahara, N.; Koike, S.; Nirasawa, T.; Kimura, H.; Ogasawara, Y. Alternative Pathway of H₂S and Polysulfides Production from Sulfurated Catalytic-Cysteine of Reaction Intermediates of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2018**, *496* (2), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.056>.
- (112) Kimura, Y.; Toyofuku, Y.; Koike, S.; Shibuya, N.; Nagahara, N.; Lefer, D.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. Identification of H₂S₃ and H₂S Produced by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Brain. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/srep14774>.
- (113) Akaike, T.; Ida, T.; Wei, F.-Y.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Alam, Md. M.; Ihara, H.; Sawa, T.; Matsunaga, T.; Kasamatsu, S.; Nishimura, A.; Morita, M.; Tomizawa, K.; Nishimura, A.; Watanabe, S.; Inaba, K.; Shima, H.; Tanuma, N.; Jung, M.; Fujii, S.; Watanabe, Y.; Ohmuraya, M.; Nagy, P.; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Motohashi, H. Cysteinyl-tRNA Synthetase Governs Cysteine Polysulfidation and Mitochondrial Bioenergetics. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 1177. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01311-y>.

- (114) Liu, H.; Radford, M. N.; Yang, C.; Chen, W.; Xian, M. Inorganic Hydrogen Polysulfides: Chemistry, Chemical Biology and Detection. *British J Pharmacology* **2019**, *176* (4), 616–627. <https://doi.org/10.1111/bph.14330>.
- (115) Nagahara, N.; Yoshii, T.; Abe, Y.; Matsumura, T. Thioredoxin-Dependent Enzymatic Activation of Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (3), 1561–1569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605931200>.
- (116) Moustafa, A.; Habara, Y. Cross Talk between Polysulfide and Nitric Oxide in Rat Peritoneal Mast Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2016**, *310* (11), C894–C902. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00028.2016>.
- (117) Miyamoto, R.; Koike, S.; Takano, Y.; Shibuya, N.; Kimura, Y.; Hanaoka, K.; Urano, Y.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. Polysulfides (H₂S_n) Produced from the Interaction of Hydrogen Sulfide (H₂S) and Nitric Oxide (NO) Activate TRPA1 Channels. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 45995. <https://doi.org/10.1038/srep45995>.
- (118) Kimura, Y.; Koike, S.; Shibuya, N.; Lefer, D.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Potential Redox Regulators Cysteine- and Glutathione-Persulfide (Cys-SSH and GSSH) Together with Signaling Molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 10459. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11004-7>.
- (119) Kimura, H. Signaling by Hydrogen Sulfide (H₂ S) and Polysulfides (H₂ S_n) and the Interaction with Other Signaling Pathways. In *Hydrogen Sulfide*; Pluth, M. D., Ed.; Wiley, 2022; pp 27–47. <https://doi.org/10.1002/9781119799900.ch2>.
- (120) Koike, S.; Kawamura, K.; Kimura, Y.; Shibuya, N.; Kimura, H.; Ogasawara, Y. Analysis of Endogenous H₂S and H₂S_n in Mouse Brain by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence and Tandem Mass Spectrometric Detection. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *113*, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.346>.
- (121) Greiner, R.; Pálincás, Z.; Bäsell, K.; Becher, D.; Antelmann, H.; Nagy, P.; Dick, T. P. Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *19* (15), 1749–1765. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5041>.
- (122) Hatakeyama, Y.; Takahashi, K.; Tominaga, M.; Kimura, H.; Ohta, T. Polysulfide Evokes Acute Pain through the Activation of Nociceptive TRPA1 in Mouse Sensory Neurons. *Mol Pain* **2015**, *11*, s12990-015–0023. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0023-4>.
- (123) Stubbert, D.; Pryszazhna, O.; Rudyk, O.; Scotcher, J.; Burgoyne, J. R.; Eaton, P. Protein Kinase G I α Oxidation Paradoxically Underlies Blood Pressure Lowering by the Reductant Hydrogen Sulfide Novelty and Significance. *Hypertension* **2014**, *64* (6), 1344–1351. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04281>.
- (124) Furuie, H.; Kimura, Y.; Akaishi, T.; Yamada, M.; Miyasaka, Y.; Saitoh, A.; Shibuya, N.; Watanabe, A.; Kusunose, N.; Mashimo, T.; Yoshikawa, T.; Yamada, M.; Abe, K.; Kimura, H. Hydrogen Sulfide and Polysulfides Induce GABA/Glutamate/d-Serine Release, Facilitate Hippocampal LTP, and Regulate Behavioral Hyperactivity. *Sci Rep* **2023**, *13* (1), 17663. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44877-y>.
- (125) Kimura, Y.; Shibuya, N.; Kimura, H. Sulfite Protects Neurons from Oxidative Stress. *British J Pharmacology* **2019**, *176* (4), 571–582. <https://doi.org/10.1111/bph.14373>.
- (126) Nelp, M. T.; Zheng, V.; Davis, K. M.; Stiefel, K. J. E.; Groves, J. T. Potent Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Polysulfides. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (38), 15288–15300. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b07338>.
- (127) Chivers, T.; Elder, P. J. W. Ubiquitous Trisulfur Radical Anion: Fundamentals and Applications in Materials Science, Electrochemistry, Analytical Chemistry and Geochemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (14), 5996. <https://doi.org/10.1039/c3cs60119f>.

- (128) Chivers, T.; Oakley, R. T. Structures and Spectroscopic Properties of Polysulfide Radical Anions: A Theoretical Perspective. *Molecules* **2023**, *28* (15), 5654. <https://doi.org/10.3390/molecules28155654>.
- (129) Mills, G.; Schmidt, K. H.; Matheson, M. S.; Meisel, D. Thermal and Photochemical Reactions of Sulfhydryl Radicals. Implications for Colloid Photocorrosion. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (6), 1590–1596. <https://doi.org/10.1021/j100290a060>.
- (130) Karmann, W.; Meissner, G.; Henglein, A. Pulsradiolyse Des Schwefelwasserstoffs in Wäßriger Lösung. *Zeitschrift für Naturforschung B* **1967**, *22* (3), 273–282. <https://doi.org/10.1515/znB-1967-0311>.
- (131) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$ in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1988**, *17* (2), 513–886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>.
- (132) 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 Radical Biology and Medicine* **2011**, *50* (1), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.705>.
- (133) Asmus, K. D. Stabilization of Oxidized Sulfur Centers in Organic Sulfides. Radical Cations and Odd-Electron Sulfur-Sulfur Bonds. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12* (12), 436–442. <https://doi.org/10.1021/ar50144a003>.
- (134) Nagarajan, V.; Fessenden, R. W. Flash Photolysis of Transient Radicals. 1. X_2^- with $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$, and SCN . *J. Phys. Chem.* **1985**, *89* (11), 2330–2335. <https://doi.org/10.1021/j100257a037>.
- (135) Huie, R. E.; Clifton, C. L.; Altstein, N. A Pulse Radiolysis and Flash Photolysis Study of the Radicals SO_2^- , SO_3^- , SO_4^- and SO_5^- . *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* **1989**, *33* (4), 361–370. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(89\)90034-9](https://doi.org/10.1016/1359-0197(89)90034-9).
- (136) Zhu, J.; Petit, K.; Colson, A. O.; DeBolt, S.; Sevilla, M. D. Reactions of Sulfhydryl and Sulfide Radicals with Oxygen, Hydrogen Sulfide, Hydrosulfide, and Sulfide: Formation of SO_2^- , HSSH^- , HSS_2^- and HSS^- . *J. Phys. Chem.* **1991**, *95* (9), 3676–3681. <https://doi.org/10.1021/j100162a044>.
- (137) Gao, Y.; Toubaei, A.; Kong, X.; Wu, G. Solving the 170-Year-Old Mystery About Red-Violet and Blue Transient Intermediates in the Gmelin Reaction. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (48), 17172–17177. <https://doi.org/10.1002/chem.201503353>.
- (138) Brauer, G. *Handbook of Preparative Inorganic chemistry* Georg, 2nd ed.; 1963; Vol. 1.
- (139) Lykakis, I. N.; Ferreri, C.; Chatgililoglu, C. The Sulfhydryl Radical ($\text{HS}/\cdot\text{S}-$): A Contender for the Isomerization of Double Bonds in Membrane Lipids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (11), 1914–1916. <https://doi.org/10.1002/anie.200604525>.
- (140) Bieza, S. A.; Boubeta, F.; Feis, A.; Smulevich, G.; Estrin, D. A.; Boechi, L.; Bari, S. E. Reactivity of Inorganic Sulfide Species toward a Heme Protein Model. *Inorganic Chemistry* **2015**, *54* (2), 527–533. <https://doi.org/10.1021/ic502294z>.
- (141) Bostelaar, T.; Vitvitsky, V.; Kumutima, J.; Lewis, B. E.; Yadav, P. K.; Brunold, T. C.; Filipovic, M.; Lehnert, N.; Stemmler, T. L.; Banerjee, R. Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (27), 8476–8488. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03456>.
- (142) 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. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290 (45), 26866–26880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672816>.
- (143) Boubeta, F. M.; Bieza, S. A.; Bringas, M.; Estrin, D. A.; Boechi, L.; Bari, S. E. Mechanism of Sulfide Binding by Ferric Hemeproteins. *Inorg. Chem.* **2018**, 57 (13), 7591–7600. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00478>.
- (144) Wedmann, R.; Bertlein, S.; Macinkovic, I.; Böltz, S.; Miljkovic, J. Lj.; Muñoz, L. E.; Herrmann, M.; Filipovic, M. R. Working with “H₂S”: Facts and Apparent Artifacts. *Nitric Oxide* **2014**, 41, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.06.003>.
- (145) Nagy, P.; Pálincás, Z.; Nagy, A.; Budai, B.; Tóth, I.; Vasas, A. Chemical Aspects of Hydrogen Sulfide Measurements in Physiological Samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, 1840 (2), 876–891. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.037>.
- (146) Kuban, Vlastimil.; Dasgupta, P. K.; Marx, J. N. Nitroprusside and Methylene Blue Methods for Silicone Membrane Differentiated Flow Injection Determination of Sulfide in Water and Wastewater. *Anal. Chem.* **1992**, 64 (1), 36–43. <https://doi.org/10.1021/ac00025a008>.
- (147) Reese, B. K.; Finneran, D. W.; Mills, H. J.; Zhu, M.-X.; Morse, J. W. Examination and Refinement of the Determination of Aqueous Hydrogen Sulfide by the Methylene Blue Method. *Aquat Geochem* **2011**, 17 (4–5), 567–582. <https://doi.org/10.1007/s10498-011-9128-1>.
- (148) Zhang, Y. X.; Field, R. J. Simplification of a Mechanism of the Methylene Blue Hydrosulfide-Oxygen CSTR Oscillator: A Homogeneous Oscillatory Mechanism with Nonlinearities but No Autocatalysis. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95 (2), 723–727. <https://doi.org/10.1021/j100155a043>.
- (149) Wood, J. L. Sulfane Sulfur. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1987; Vol. 143, pp 25–29.
- (150) Shieh, M.; Xu, S.; Lederberg, O. L.; Xian, M. Detection of Sulfane Sulfur Species in Biological Systems. *Redox Biology* **2022**, 57, 102502. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102502>.
- (151) Koike, S.; Ogasawara, Y. Analysis and Characterization of Sulfane Sulfur. *Analytical Biochemistry* **2024**, 115458. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115458>.
- (152) Sörbo, B. A Colorimetric Method for the Determination of Thiosulfate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1957**, 23, 412–416. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90346-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90346-3).
- (153) 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 Radical Biology and Medicine* **2023**, 207, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.07.006>.
- (154) Getz, E. B.; Xiao, M.; Chakrabarty, T.; Cooke, R.; Selvin, P. R. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry* **1999**, 273 (1), 73–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4203>.
- (155) Santarino, I. B.; Oliveira, S. C. B.; Oliveira-Brett, A. M. Protein Reducing Agents Dithiothreitol and Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine Anodic Oxidation. *Electrochemistry Communications* **2012**, 23, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2012.06.027>.
- (156) Mthembu, S. N.; Sharma, A.; Albericio, F.; De La Torre, B. G. Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents. *ChemBioChem* **2020**, 21 (14), 1947–1954. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000092>.
- (157) Ahriks, A.; Robert, J.; Anouti, M.; Paris, J.; Jiang, Z.-H.; Yan, S.-P.; Wang, G.-L.; Yao, X.-K.; Wang, H.-G.; Tuchagues, J.-P.; Ögren, M. Nucleophilic Substitution of Alkyl Halides by Electrogenerated Polysulfide Ions in N,N-Dimethylacetamide. *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53, 513–520. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.53-0513>.
- (158) Hamid, H. A.; Tanaka, A.; Ida, T.; Nishimura, A.; Matsunaga, T.; Fujii, S.; Morita, M.; Sawa, T.; Fukuto, J. M.; Nagy, P.; Tsutsumi, R.; Motohashi, H.; Ihara, H.; Akaike, T. Polysulfide

- Stabilization by Tyrosine and Hydroxyphenyl-Containing Derivatives That Is Important for a Reactive Sulfur Metabolomics Analysis. *Redox Biology* **2019**, *21*, 101096. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101096>.
- (159) Takata, T.; Jung, M.; Matsunaga, T.; Ida, T.; Morita, M.; Motohashi, H.; Shen, X.; Kevil, C. G.; Fukuto, J. M.; Akaike, T. Methods in Sulfide and Persulfide Research. *Nitric Oxide* **2021**, *116*, 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.09.002>.
- (160) Schilling, D.; Ditrói, T.; Barayeu, U.; Jurányi, E. P.; Nagy, P.; Dick, T. P. The Influence of Alkylating Agents on Sulfur–Sulfur Bonds in per- and Polysulfides. *Current Opinion in Chemical Biology* **2023**, *76*, 102368. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102368>.
- (161) Kasamatsu, S.; Ida, T.; Koga, T.; Asada, K.; Motohashi, H.; Ihara, H.; Akaike, T. High-Precision Sulfur Metabolomics Innovated by a New Specific Probe for Trapping Reactive Sulfur Species. *Antioxidants & Redox Signaling* **2021**, *34* (18), 1407–1419. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8073>.
- (162) Shen, X.; Peter, E. A.; Bir, S.; Wang, R.; Kevil, C. G. Analytical Measurement of Discrete Hydrogen Sulfide Pools in Biological Specimens. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *52* (11–12), 2276–2283. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.007>.
- (163) Shen, X.; Pattillo, C. B.; Pardue, S.; Bir, S. C.; Wang, R.; Kevil, C. G. Measurement of Plasma Hydrogen Sulfide in Vivo and in Vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50* (9), 1021–1031. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.025>.
- (164) Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N. O.; Xian, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T. Reactive Cysteine Persulfides and S-Polythiolation Regulate Oxidative Stress and Redox Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (21), 7606–7611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321232111>.
- (165) Wintner, E. A.; Deckwerth, T. L.; Langston, W.; Bengtsson, A.; Leviten, D.; Hill, P.; Insko, M. A.; Dumpit, R.; VandenEkart, E.; Toombs, C. F.; Szabo, C. A Monobromobimane-Based Assay to Measure the Pharmacokinetic Profile of Reactive Sulphide Species in Blood: Monobromobimane Assay for Sulphide Detection. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *160* (4), 941–957. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00704.x>.
- (166) Kamyshny, A.; Goifman, A.; Rizkov, D.; Lev, O. Kinetics of Disproportionation of Inorganic Polysulfides in Undersaturated Aqueous Solutions at Environmentally Relevant Conditions. *Aquatic Geochemistry* **2003**, *9* (4), 291–304. <https://doi.org/10.1023/B:AQUA.0000029023.07252.c3>.
- (167) Filipovic, M. R. Persulfidation (S-Sulfhydration) and H₂S. In *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*; Moore, P. K., Whiteman, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 230, pp 29–59.
- (168) Wang, D.; Wang, H.; Li, H.; Liu, L.; Li, Z. Studies on the Contributions of Steric and Polarity Effects to the H₂S-Binding Properties of Vitreoscilla Hemoglobin. *Journal of Molecular Structure* **2017**, *1128*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.08.082>.
- (169) Zarekiewicz, J.; Perez-Ternero, C.; Kojasoy, V.; McGinity, C.; Khodade, V. S.; Lin, J.; Tantillo, D. J.; Toscano, J. P.; Hobbs, A. J.; Fukuto, J. M. The Reaction of Hydropersulfides (RSSH) with S-Nitrosothiols (RS-NO) and the Biological/Physiological Implications. *Free Radical Biology and Medicine* **2022**, *188*, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.245>.
- (170) Foglia, N. O.; Bari, S. E.; Estrin, D. A. In Silico Insight into the Reductive Nitrosylation of Ferric Hemoproteins. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (6), 3631–3641. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03198>.

- (171) Ford, P. C.; Fernandez, B. O.; Lim, M. D. Mechanisms of Reductive Nitrosylation in Iron and Copper Models Relevant to Biological Systems. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 2439–2456. <https://doi.org/10.1021/cr0307289>.
- (172) Hoshino, M.; Maeda, M.; Konishi, R.; Seki, H.; Ford, P. C. Studies on the Reaction Mechanism for Reductive Nitrosylation of Ferrihemoproteins in Buffer Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (24), 5702–5707. <https://doi.org/10.1021/ja953311w>.
- (173) Bickar, D.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J. Carbon Monoxide-Driven Reduction of Ferric Heme and Heme Proteins. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (17), 10777–10783.
- (174) Jensen, B.; Fago, A. Reactions of Ferric Hemoglobin and Myoglobin with Hydrogen Sulfide under Physiological Conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *182*, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.007>.
- (175) Mittra, K.; Singha, A.; Dey, A. Mechanism of Reduction of Ferric Porphyrins by Sulfide: Identification of a Low Spin FeIII-SH Intermediate. *Inorganic Chemistry* **2017**, *56* (7), 3916–3925. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02878>.
- (176) Watanabe, K.; Suzuki, T.; Kitagishi, H.; Kano, K. Reaction between a Haemoglobin Model Compound and Hydrosulphide in Aqueous Solution. *Chemical Communications* **2015**, *51* (19), 4059–4061. <https://doi.org/10.1039/C5CC00057B>.
- (177) Wajcman, H.; Kiger, L.; Marden, M. C. Structure and Function Evolution in the Superfamily of Globins. *Comptes Rendus. Biologies* **2008**, *332* (2–3), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.026>.
- (178) Boechi, L.; Arrar, M.; Martí, M. A.; Olson, J. S.; Roitberg, A. E.; Estrin, D. A. Hydrophobic Effect Drives Oxygen Uptake in Myoglobin via Histidine E7. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (9), 6754–6762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426056>.
- (179) Oohora, K.; Onoda, A.; Hayashi, T. Hemoproteins Reconstituted with Artificial Metal Complexes as Biohybrid Catalysts. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (4), 945–954. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00676>.
- (180) Schneider, S.; Marles-Wright, J.; Sharp, K. H.; Paoli, M. Diversity and Conservation of Interactions for Binding Heme in B-Type Heme Proteins. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (3), 621. <https://doi.org/10.1039/b604186h>.
- (181) Kraus, D. W.; Wittenberg, J. B. Hemoglobins of the *Lucina Pectinata*/Bacteria Symbiosis. I. Molecular Properties, Kinetics and Equilibria of Reactions with Ligands. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (27), 16043–16053.
- (182) Wang, D.; Liu, L.; Wang, H.; Xu, H.; Chen, L.; Ma, L.; Li, Z. Clues for Discovering a New Biological Function of *Vitreoscilla* Hemoglobin in Organisms: Potential Sulfide Receptor and Storage. *FEBS Letters* **2016**, *590* (8), 1132–1142. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12141>.
- (183) Droghetti, E.; Nicoletti, F. P.; Bonamore, A.; Boechi, L.; Arroyo Mañez, P.; Estrin, D. A.; Boffi, A.; Smulevich, G.; Feis, A. Heme Pocket Structural Properties of a Bacterial Truncated Hemoglobin from *Thermobifida Fusca*. *Biochemistry* **2010**, *49* (49), 10394–10402. <https://doi.org/10.1021/bi101452k>.
- (184) Vitvitsky, V.; Yadav, P. K.; Kurthen, A.; Banerjee, R. Sulfide Oxidation by a Noncanonical Pathway in Red Blood Cells Generates Thiosulfate and Polysulfides. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (13), 8310–8320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639831>.
- (185) 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: Sulfide Is a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase. *British Journal of Pharmacology* **2015**, *172* (6), 1516–1532. <https://doi.org/10.1111/bph.12769>.
- (186) Nicholls, P. The Formation and Properties of Sulphmyoglobin and Sulphcatalase. *Biochemical Journal* **1961**, *81* (2), 374–383. <https://doi.org/10.1042/bj0810374>.

- (187) Mot, A. C.; Bischin, C.; Damian, G.; Attia, A. A. A.; Gal, E.; Dina, N.; Leopold, N.; Silaghi-Dumitrescu, R. Fe(III) – Sulfide Interaction in Globins: Characterization and Quest for a Putative Fe(IV)-Sulfide Species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *179*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.015>.
- (188) Ruetz, M.; Kumutima, J.; Filipovic, M.; Lehnert, N.; Banerjee, R. Reactivity of Neuroglobin with H₂S. *The FASEB Journal* **2017**, *31* (1_supplement), 764.2-764.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.764.2.
- (189) Nakamura, S.; Nakamura, M.; Yamazaki, I.; Morrison, M. Reactions of Ferryl Lactoperoxidase (Compound II) with Sulfide and Sulfhydryl Compounds. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259* (11), 7080–7085. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39840-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39840-X).
- (190) Zhao, X.; Cao, Y.; Jin, H.; Wang, X.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Yu, Y.; Huang, Y.; Gao, Y.; Zhang, J. Hydrogen Sulfide Promotes Thyroid Hormone Synthesis and Secretion by Upregulating Sirtuin-1. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 838248. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.838248>.
- (191) Searcy, D. G.; Whitehead, J. P.; Maroney, M. J. Interaction of Cu,Zn Superoxide Dismutase with Hydrogen Sulfide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *318* (2), 251–263. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1228>.
- (192) Olson, K. R.; Gao, Y.; DeLeon, E. R.; Arif, M.; Arif, F.; Arora, N.; Straub, K. D. Catalase as a Sulfide-Sulfur Oxido-Reductase: An Ancient (and Modern?) Regulator of Reactive Sulfur Species (RSS). *Redox Biology* **2017**, *12*, 325–339. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.021>.
- (193) Vitvitsky, V.; Miljkovic, J. Lj.; Bostelaar, T.; Adhikari, B.; Yadav, P. K.; Steiger, A. K.; Torregrossa, R.; Pluth, M. D.; Whiteman, M.; Banerjee, R.; Filipovic, M. R. Cytochrome c Reduction by H₂S Potentiates Sulfide Signaling. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (8), 2300–2307. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00463>.
- (194) Pietri, R.; Román-Morales, E.; López-Garriga, J. Hydrogen Sulfide and Hemeproteins: Knowledge and Mysteries. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15* (2), 393–404. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3698>.
- (195) Bianco, C. L.; Savitsky, A.; Feelisch, M.; Cortese-Krott, M. M. Investigations on the Role of Hemoglobin in Sulfide Metabolism by Intact Human Red Blood Cells. *Biochemical Pharmacology* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.045>.
- (196) Jensen, B.; Fago, A. A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood. *Antioxidants & Redox Signaling* **2019**, *ars.2019.7877*. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7877>.
- (197) Boubeta, F. M.; Bari, S. E.; Estrin, D. A.; Boechi, L. Access and Binding of H₂S to Hemeproteins: The Case of Hbl of *Lucina Pectinata*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (36), 9642–9653. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b06686>.
- (198) Zhao, Z.; Wang, D.; Wang, M.; Sun, X.; Wang, L.; Huang, X.; Ma, L.; Li, Z. Proximal Environment Controlling the Reactivity between Inorganic Sulfide and Heme-Peptide Model. *RSC Advances* **2016**, *6* (82), 78858–78864. <https://doi.org/10.1039/C6RA14100E>.
- (199) Freindorf, M.; Antonio, J.; Kraka, E. Hydrogen Sulfide Ligation in Hemoglobin I of *Lucina Pectinata* – A QM/MM and Local Mode Study. *J. Phys. Chem. A* **2023**, *127* (40), 8316–8329. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.3c04399>.
- (200) Vitvitsky, V.; Yadav, P. K.; An, S.; Seravalli, J.; Cho, U. S.; Banerjee, R. Structural and Mechanistic Insights into Hemoglobincatalyzed Hydrogen Sulfide Oxidation and the Fate of Polysulfide Products. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292* (13), 5584–5592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.774943>.

- (201) Hartle, M. D.; Prell, J. S.; Pluth, M. D. Spectroscopic Investigations into the Binding of Hydrogen Sulfide to Synthetic Picket-Fence Porphyrins. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (11), 4843–4853. <https://doi.org/10.1039/C5DT04563K>.
- (202) Cao, W.; Christian, J. F.; Champion, P. M.; Rosca, F.; Sage, J. T. Water Penetration and Binding to Ferric Myoglobin. *Biochemistry* **2001**, 40 (19), 5728–5737. <https://doi.org/10.1021/bi010067e>.
- (203) Ostrich, I. J.; Liu, G.; Dodgen, H. W.; Hunt, J. P. Oxygen-17 Nuclear Magnetic Resonance Study of Water Exchange on Water-Soluble Iron(III) Porphyrins. *Inorg. Chem.* **1980**, 19 (3), 619–621. <https://doi.org/10.1021/ic50205a009>.
- (204) Nicoletti, F. P.; Droghetti, E.; Howes, B. D.; Bustamante, J. P.; Bonamore, A.; Sciamanna, N.; Estrin, D. A.; Feis, A.; Boffi, A.; Smulevich, G. H-Bonding Networks of the Distal Residues and Water Molecules in the Active Site of Thermobifida Fusca Hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2013**, 1834 (9), 1901–1909. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.02.033>.
- (205) Bilska-Wilkosz, A.; Iciek, M.; Górny, M.; Kowalczyk-Pachel, D. The Role of Hemoproteins: Hemoglobin, Myoglobin and Neuroglobin in Endogenous Thiosulfate Production Processes. *IJMS* **2017**, 18 (6), 1315. <https://doi.org/10.3390/ijms18061315>.
- (206) Yin, X.; Li, X.; Li, Q.; Wang, B.; Zheng, L. Complete Genome Analysis Reveals Environmental Adaptability of Sulfur-Oxidizing Bacterium Thioclava Nitratireducens M1-LQ-LJL-11 and Symbiotic Relationship with Deep-Sea Hydrothermal Vent Chrysomallon Squamiferum. *Marine Genomics* **2023**, 71, 101058. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2023.101058>.
- (207) Kimura, H. Signaling by Hydrogen Sulfide (H₂S) and Polysulfides (H₂Sn) in the Central Nervous System. *Neurochemistry International* **2019**, 126, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.01.027>.
- (208) Hoppe-seyler, F. Ueber Die Zersetzungsproducte Des Hämoglobins. **1864**.
- (209) keilin, david. On the Combinations of Methæmoglobin with H₂ S. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **1933**, 113 (784), 393–404. <https://doi.org/10.1098/rspb.1933.0056>.
- (210) Berzofsky, J. A.; Peisach, J.; Blumberg, W. E. Sulfheme Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246 (10), 3367–3377. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62234-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62234-3).
- (211) Berzofsky, J. A.; Peisach, J.; Blumberg, W. E. Sulfheme Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246 (23), 7366–7372. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45895-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45895-X).
- (212) Carrico, R. J.; Blumberg, W. E.; Peisach, J. The Reversible Binding of Oxygen to Sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, 253 (20), 7212–7215. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34486-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34486-1).
- (213) Brittain, T.; Greenwood, C.; Barber, D. A Characterization of Ferric Sulphaemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1982**, 705 (1), 26–32. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90331-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90331-4).
- (214) Timkovich, R.; Vavra, M. R. Proton NMR Spectroscopy of Sulfmyoglobin. *Biochemistry* **1985**, 24 (19), 5189–5196. <https://doi.org/10.1021/bi00340a035>.
- (215) Bondoc, L. L.; Chau, M. H.; Price, M. A.; Timkovich, R. Structure of a Stable Form of Sulfheme. *Biochemistry* **1986**, 25 (26), 8458–8466. <https://doi.org/10.1021/bi00374a021>.
- (216) Romero, F. J.; Ordoñez, I.; Arduini, A.; Cadenas, E. The Reactivity of Thiols and Disulfides with Different Redox States of Myoglobin. Redox and Addition Reactions and Formation of Thiyl Radical Intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267 (3), 1680–1688. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45999-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45999-6).
- (217) Andersson, L. A.; Loehr, T. M.; Lim, A. R.; Mauk, A. G. Sulfmyoglobin. Resonance Raman Spectroscopic Evidence for an Iron-Chlorin Prosthetic Group. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259 (24), 15340–15349. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42555-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42555-5).

- (218) Chatfield, M. J.; La Mar, G. N.; Balch, A. L.; Lecomte, J. T. J. Multiple Forms of Sulfmyoglobin as Detected by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, *135* (1), 309–315. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90978-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90978-2).
- (219) Chatfield, M. J.; La Mar, G. N.; Kauten, R. J. Proton NMR Characterization of Isomeric Sulfmyoglobins: Preparation, Interconversion, Reactivity Patterns, and Structural Features. *Biochemistry* **1987**, *26* (22), 6939–6950. <https://doi.org/10.1021/bi00396a013>.
- (220) Ríos-González, B. B.; Román-Morales, E. M.; Pietri, R.; López-Garriga, J. Hydrogen Sulfide Activation in Hemeproteins: The Sulfheme Scenario. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *133*, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.013>.
- (221) Michel, H. O. A STUDY OF SULFHEMOGLOBIN. *Journal of Biological Chemistry* **1938**, *126* (1), 323–348. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)73923-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73923-9).
- (222) Berzofsky, J. A.; Peisach, J.; Horecker, B. L. Sulfheme Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247* (12), 3783–3791. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45103-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45103-X).
- (223) Chatfield, M. J.; La Mar, G. N.; Smith, K. M.; Leung, H. K.; Pandey, R. K. Identification of the Altered Pyrrole in the Isomeric Sulfmyoglobins: Hyperfine Shift Patterns as Indicators of Ring Saturation in Ferric Chlorins. *Biochemistry* **1988**, *27* (5), 1500–1507. <https://doi.org/10.1021/bi00405a016>.
- (224) Scharberg, M. A.; La Mar, G. N. Sulfmyoglobin Derived from Deuterohemin Reconstituted Protein. 2. Molecular and Electronic Structure Determination of Two Extracted Prosthetic Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (15), 6522–6528. <https://doi.org/10.1021/ja00068a008>.
- (225) Scharberg, M. A.; La Mar, G. N. Sulfmyoglobin Derived from Deuterohemin Reconstituted Protein. 1. Structure of the Initial Complex Based on the Mechanism of Formation of Subsequent Reaction Products. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (15), 6513–6521. <https://doi.org/10.1021/ja00068a007>.
- (226) Galardon, E.; Huguet, F.; Herrero, C.; Ricoux, R.; Artaud, I.; Padovani, D. Reactions of Persulfides with the Heme Cofactor of Oxidized Myoglobin and Microperoxidase 11: Reduction or Coordination. *Dalton Transactions* **2017**, *46* (24), 7939–7946. <https://doi.org/10.1039/c7dt01638g>.
- (227) Álvarez, L.; Suarez Vega, V.; McGinity, C.; Khodade, V. S.; Toscano, J. P.; Nagy, P.; Lin, J.; Works, C.; Fukuto, J. M. The Reactions of Hydropersulfides (RSSH) with Myoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2020**, *687*, 108391. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108391>.
- (228) Palermo, J. C.; Colombo, M. C.; Scocozza, M. F.; Murgida, D. H.; Estrin, D. A.; Bari, S. E. Reduction of Metmyoglobin by Inorganic Disulfide Species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, *245*, 112256. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112256>.
- (229) Erecińska, M.; Silver, I. A. Tissue Oxygen Tension and Brain Sensitivity to Hypoxia. *Respiration Physiology* **2001**, *128* (3), 263–276. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00306-1).
- (230) Marutani, E.; Morita, M.; Hirai, S.; Kai, S.; Grange, R. M. H.; Miyazaki, Y.; Nagashima, F.; Traeger, L.; Magliocca, A.; Ida, T.; Matsunaga, T.; Flicker, D. R.; Corman, B.; Mori, N.; Yamazaki, Y.; Batten, A.; Li, R.; Tanaka, T.; Ikeda, T.; Nakagawa, A.; Atochin, D. N.; Ihara, H.; Olenchock, B. A.; Shen, X.; Nishida, M.; Hanaoka, K.; Kevil, C. G.; Xian, M.; Bloch, D. B.; Akaike, T.; Hindle, A. G.; Motohashi, H.; Ichinose, F. Sulfide Catabolism Ameliorates Hypoxic Brain Injury. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 3108. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23363-x>.
- (231) Luo, Y.; Liu, X.; Zheng, Q.; Wan, X.; Ouyang, S.; Yin, Y.; Sui, X.; Liu, J.; Yang, X. Hydrogen Sulfide Prevents Hypoxia-Induced Apoptosis via Inhibition of an H₂O₂-Activated Calcium Signaling Pathway in Mouse Hippocampal Neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *425* (2), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.131>.

- (232) Brahimi-Horn, M. C. Oxygen, a Source of Life and Stress. *FEBS Letters* **2007**, 581 (19). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(07\)00764-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(07)00764-8).
- (233) Elsherbiny, M. E.; Shaaban, M.; El-Tohamy, R.; Elkholi, I. E.; Hammam, O. A.; Magdy, M.; Allalunis-Turner, J.; Emara, M. Expression of Myoglobin in Normal and Cancer Brain Tissues: Correlation With Hypoxia Markers. *Front. Oncol.* **2021**, 11, 590771. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.590771>.
- (234) Elkholi, I. E.; Elsherbiny, M. E.; Emara, M. Myoglobin: From Physiological Roles to Potential Implications in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2022**, 1877 (3), 188706. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188706>.
- (235) Aboouf, M. A.; Gorr, T. A.; Hamdy, N. M.; Gassmann, M.; Thiersch, M. Myoglobin in Brown Adipose Tissue: A Multifaceted Player in Thermogenesis. *Cells* **2023**, 12 (18), 2240. <https://doi.org/10.3390/cells12182240>.
- (236) Gottschalk, P. G.; Dunn, J. R. The Five-Parameter Logistic: A Characterization and Comparison with the Four-Parameter Logistic. *Analytical Biochemistry* **2005**, 343 (1), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.035>.
- (237) Lente, G.; Bazsa, G.; Fábrián, I. What Is and What Isn't a Clock Reaction? *New Journal of Chemistry* **2007**, 31 (10), 1707. <https://doi.org/10.1039/b708846a>.
- (238) Horváth, A. K.; Nagypál, I. Classification of Clock Reactions. *ChemPhysChem* **2015**, 16 (3), 588–594. <https://doi.org/10.1002/cphc.201402806>.
- (239) Focke, W. W.; van der Westhuizen, I.; Musee, N.; Loots, M. T. Kinetic Interpretation of Log-Logistic Dose-Time Response Curves. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 2234. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02474-w>.
- (240) Lee, M. W.; Meuwly, M. Hydration Free Energies of Cyanide and Hydroxide Ions from Molecular Dynamics Simulations with Accurate Force Fields. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15 (46), 20303. <https://doi.org/10.1039/c3cp52713a>.
- (241) Sadlej-Sosnowska, N. Calculation of Acidic Dissociation Constants in Water: Solvation Free Energy Terms. Their Accuracy and Impact. *Theor Chem Account* **2007**, 118 (2), 281–293. <https://doi.org/10.1007/s00214-006-0232-z>.
- (242) Tawa, G. J.; Topol, I. A.; Burt, S. K.; Caldwell, R. A.; Rashin, A. A. Calculation of the Aqueous Solvation Free Energy of the Proton. *The Journal of Chemical Physics* **1998**, 109 (12), 4852–4863. <https://doi.org/10.1063/1.477096>.
- (243) Yu, H.-Z.; Yang, Y.-M.; Zhang, L.; Dang, Z.-M.; Hu, G.-H. Quantum-Chemical Predictions of pK_a 's of Thiols in DMSO. *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118 (3), 606–622. <https://doi.org/10.1021/jp410274n>.
- (244) Ho, J.; Coote, M. L. pK_a Calculation of Some Biologically Important Carbon Acids - An Assessment of Contemporary Theoretical Procedures. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5 (2), 295–306. <https://doi.org/10.1021/ct800335v>.
- (245) Standard, J. M.; Buckner, I. S.; Pulsifer, D. H. Basis Set Effects in Ab Initio Studies of Sulfur Trioxide–Water Complexes. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2004**, 673 (1–3), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.11.043>.
- (246) Khalizov, A. F.; Ariya, P. A. Stability of XS_2 (X=F, Cl, and Br) Radical: Impact of the Basis Set on X–S Bonding Energy in Ab Initio and DFT Calculations. *Chemical Physics Letters* **2001**, 350 (1–2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(01\)01290-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(01)01290-8).
- (247) Hahn, D. K.; Raghuveer, K.; Ortiz, J. V. Computational Tests of Quantum Chemical Models for Excited and Ionized States of Molecules with Phosphorus and Sulfur Atoms. *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118 (19), 3514–3524. <https://doi.org/10.1021/jp502462w>.
- (248) Bishop, R. F. An Overview of Coupled Cluster Theory and Its Applications in Physics. *Theoret. Chim. Acta* **1991**, 80 (2–3), 95–148. <https://doi.org/10.1007/BF01119617>.

- (249) Palermo, J. C.; Córdova, J. A.; Semelak, J. A.; Capece, L.; Bari, S. E.; Estrin, D. A. Computational Evaluation of Relevant Species in Inorganic Sulfur Biochemistry. *Electron. Struct.* **2022**, *4* (4), 044006. <https://doi.org/10.1088/2516-1075/aca945>.
- (250) Brařda, B.; Thogersen, L.; Wu, W.; Hiberty, P. C. Stability, Metastability, and Unstability of Three-Electron-Bonded Radical Anions. A Model Ab Initio Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (39), 11781–11790. <https://doi.org/10.1021/ja026707y>.
- (251) Danovich, D.; Foroutan-Nejad, C.; Hiberty, P. C.; Shaik, S. Nature of the Three-Electron Bond. *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122* (7), 1873–1885. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b11919>.
- (252) Gill, P. M. W.; Radom, Leo. Structures and Stabilities of Singly Charged Three-Electron Hemibonded Systems and Their Hydrogen-Bonded Isomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (15), 4931–4941. <https://doi.org/10.1021/ja00223a010>.
- (253) Córdova, J. A.; Palermo, J. C.; Estrin, D. A.; Bari, S. E.; Capece, L. Binding Mechanism of Disulfide Species to Ferric Hemeproteins: The Case of Metmyoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, *247*, 112313. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112313>.
- (254) Makino, K.; Hagiwara, T.; Murakami, A. A Mini Review: Fundamental Aspects of Spin Trapping with DMPO. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* **1991**, *37* (5–6), 657–665. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(91\)90164-W](https://doi.org/10.1016/1359-0197(91)90164-W).
- (255) Villamena, F. A.; Locigno, E. J.; Rockenbauer, A.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. Theoretical and Experimental Studies of the Spin Trapping of Inorganic Radicals by 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline N -Oxide (DMPO). 1. Carbon Dioxide Radical Anion. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (49), 13253–13258. <https://doi.org/10.1021/jp064892m>.
- (256) Zamora, P. L.; Villamena, F. A. Theoretical and Experimental Studies of the Spin Trapping of Inorganic Radicals by 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline N -Oxide (DMPO). 3. Sulfur Dioxide, Sulfite, and Sulfate Radical Anions. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (26), 7210–7218. <https://doi.org/10.1021/jp3039169>.
- (257) Potapenko, D. I.; Bagryanskaya, E. G.; Tsentalovich, Y. P.; Reznikov, V. A.; Clanton, T. L.; Khramtsov, V. V. Reversible Reactions of Thiols and Thiyl Radicals with Nitron Spin Traps. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (26), 9315–9324. <https://doi.org/10.1021/jp049026t>.
- (258) Davies, M. J.; Forni, L. G.; Shuter, S. L. Electron Spin Resonance and Pulse Radiolysis Studies on the Spin Trapping of Sulphur-Centered Radicals. *Chemico-Biological Interactions* **1987**, *61* (2), 177–188. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(87\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(87)90038-X).
- (259) Scott, M. J.; Billiar, T. R.; Stoyanovsky, D. A. N-Tert-Butylmethanimine N-Oxide Is an Efficient Spin-Trapping Probe for EPR Analysis of Glutathione Thiyl Radical. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 38773. <https://doi.org/10.1038/srep38773>.
- (260) Janzen, E.; Kotake, Y.; Randall, H. Stabilities of Hydroxyl Radical Spin Adducts of PBN-Type Spin Traps☆. *Free Radical Biology and Medicine* **1992**, *12* (2), 169–173. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90011-5).
- (261) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Radical: Practical Aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1980**, *200* (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90323-9).
- (262) Janzen, E. G. Spin Trapping. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4* (1), 31–40. <https://doi.org/10.1021/ar50037a005>.
- (263) Graceffa, P. Spin Trapping the Cysteine Thiyl Radical with Phenyl-N-t-Butylnitron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1988**, *954*, 227–230. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90076-3](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90076-3).

- (264) Polovyanenko, D. N.; Plyusnin, V. F.; Reznikov, V. A.; Khramtsov, V. V.; Bagryanskaya, E. G. Mechanistic Studies of the Reactions of Nitron Spin Trap PBN with Glutathionyl Radical. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (15), 4841–4847. <https://doi.org/10.1021/jp711548x>.
- (265) Mason, R. P. Using Anti-5,5-Dimethyl-1-Pyrroline N-Oxide (Anti-DMPO) to Detect Protein Radicals in Time and Space with Immuno-Spin Trapping. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *36* (10), 1214–1223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.077>.
- (266) M. J. Frisch, G. W. T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009. *Gaussian 09, Revision D.01*.
- (267) Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Radicals. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1984; Vol. 105, pp 198–209. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05026-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05026-6).
- (268) Buettner, G. R.; Mason, R. P. [9] Spin-Trapping Methods for Detecting Superoxide and Hydroxyl Free Radicals in Vitro and in Vivo. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1990; Vol. 186, pp 127–133. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86101-Z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86101-Z).
- (269) Tomita, A.; Kreutzer, U.; Adachi, S.; Koshihara, S.; Jue, T. 'It's Hollow': The Function of Pores within Myoglobin. *Journal of Experimental Biology* **2010**, *213* (16), 2748–2754. <https://doi.org/10.1242/jeb.042994>.
- (270) Cohen, J.; Arkhipov, A.; Braun, R.; Schulten, K. Imaging the Migration Pathways for O₂, CO, NO, and Xe Inside Myoglobin. *Biophysical Journal* **2006**, *91* (5), 1844–1857. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.085746>.
- (271) Bossa, C.; Anselmi, M.; Roccatano, D.; Amadei, A.; Vallone, B.; Brunori, M.; Di Nola, A. Extended Molecular Dynamics Simulation of the Carbon Monoxide Migration in Sperm Whale Myoglobin. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (6), 3855–3862. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.037432>.
- (272) Tilton, R. F.; Singh, U. C.; Kuntz, I. D.; Kollman, P. A. Protein-Ligand Dynamics. *Journal of Molecular Biology* **1988**, *199* (1), 195–211. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90389-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90389-0).
- (273) Hancock, J. T. Are Protein Cavities and Pockets Commonly Used by Redox Active Signalling Molecules? *Plants* **2023**, *12* (14), 2594. <https://doi.org/10.3390/plants12142594>.
- (274) Schoenborn, B. P.; Watson, H. C.; Kendrew, J. C. Binding of Xenon to Sperm Whale Myoglobin. *Nature* **1965**, *207* (4992), 28–30. <https://doi.org/10.1038/207028a0>.
- (275) Frauenfelder, H.; McMahon, B. H. Relaxations and Fluctuations in Myoglobin. *Biosystems* **2001**, *62* (1–3), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0303-2647\(01\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0303-2647(01)00132-0).
- (276) Lepeshkevich, S. V.; Gilevich, S. N.; Parkhats, M. V.; Dzhabarov, B. M. Molecular Oxygen Migration through the Xenon Docking Sites of Human Hemoglobin in the R-State. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2016**, *1864* (9), 1110–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.004>.
- (277) Tetreau, C.; Blouquit, Y.; Novikov, E.; Quiniou, E.; Lavalette, D. Competition with Xenon Elicits Ligand Migration and Escape Pathways in Myoglobin. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (1), 435–447. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74120-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74120-X).

- (278) Chu, K.; Vojtchovský, J.; McMahon, B. H.; Sweet, R. M.; Berendzen, J.; Schlichting, I. Structure of a Ligand-Binding Intermediate in Wild-Type Carbonmonoxy Myoglobin. *Nature* **2000**, *403* (6772), 921–923. <https://doi.org/10.1038/35002641>.
- (279) Nishihara, Y.; Sakakura, M.; Kimura, Y.; Terazima, M. The Escape Process of Carbon Monoxide from Myoglobin to Solution at Physiological Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (38), 11877–11888. <https://doi.org/10.1021/ja038877w>.
- (280) Brunori, M. Nitric Oxide Moves Myoglobin Centre Stage. *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, *26* (4), 209–210. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01824-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01824-2).
- (281) Brunori, M. Structural Dynamics of Myoglobin. *Biophys. Chem.* **2000**, *86* (2–3), 221–230.
- (282) Gibson, Q. H.; Regan, R.; Elber, R.; Olson, J. S.; Carver, T. E. Distal Pocket Residues Affect Picosecond Ligand Recombination in Myoglobin. An Experimental and Molecular Dynamics Study of Position 29 Mutants. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (31), 22022–22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41630-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41630-4).
- (283) Daigle, R.; Rousseau, J.-A.; Guertin, M.; Lagüe, P. Theoretical Investigations of Nitric Oxide Channeling in Mycobacterium Tuberculosis Truncated Hemoglobin N. *Biophysical Journal* **2009**, *97* (11), 2967–2977. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.006>.
- (284) Tilton, R. F.; Singh, U. C.; Weiner, S. J.; Connolly, M. L.; Kuntz, I. D.; Kollman, P. A.; Max, N.; Case, D. A. Computational Studies of the Interaction of Myoglobin and Xenon. *Journal of Molecular Biology* **1986**, *192* (2), 443–456. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90374-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90374-8).
- (285) Rubin, S. M.; Spence, M. M.; Goodson, B. M.; Wemmer, D. E.; Pines, A. Evidence of Nonspecific Surface Interactions between Laser-Polarized Xenon and Myoglobin in Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97* (17), 9472–9475. <https://doi.org/10.1073/pnas.170278897>.
- (286) Zhang, D.; Macinkovic, I.; Devarie-Baez, N. O.; Pan, J.; Park, C.; Carroll, K. S.; Filipovic, M. R.; Xian, M. Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. *Angew Chem Int Ed* **2014**, *53* (2), 575–581. <https://doi.org/10.1002/anie.201305876>.
- (287) Park, C.-M.; Macinkovic, I.; Filipovic, M. R.; Xian, M. Use of the “Tag-Switch” Method for the Detection of Protein S-Sulfhydration. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2015; Vol. 555, pp 39–56. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.033>.
- (288) Wedmann, R.; Onderka, C.; Wei, S.; Szióártó, I. A.; Miljkovic, J. Lj.; Mitrovic, A.; Lange, M.; Savitsky, S.; Yadav, P. K.; Torregrossa, R.; Harrer, E. G.; Harrer, T.; Ishii, I.; Gollasch, M.; Wood, M. E.; Galardon, E.; Xian, M.; Whiteman, M.; Banerjee, R.; Filipovic, M. R. Improved Tag-Switch Method Reveals That Thioredoxin Acts as Depersulfidase and Controls the Intracellular Levels of Protein Persulfidation. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (5), 3414–3426. <https://doi.org/10.1039/C5SC04818D>.
- (289) Roach, M. P.; Pond, A. E.; Thomas, M. R.; Boxer, S. G.; Dawson, J. H. The Role of the Distal and Proximal Protein Environments in Controlling the Ferric Spin State and in Stabilizing Thiolate Ligation in Heme Systems: Thiolate Adducts of the Myoglobin H93G Cavity Mutant. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (51), 12088–12093. <https://doi.org/10.1021/ja9915504>.
- (290) Jónsson, H.; Mills, G.; Jacobsen, K. W. Nudged Elastic Band Method for Finding Minimum Energy Paths of Transitions. In *Classical and Quantum Dynamics in Condensed Phase Simulations*; WORLD SCIENTIFIC: LERICI, Villa Marigola, 1998; pp 385–404. https://doi.org/10.1142/9789812839664_0016.
- (291) Spiro, T. G.; Strekas, T. C. Resonance Raman Spectra of Heme Proteins. Effects of Oxidation and Spin State. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (2), 338–345. <https://doi.org/10.1021/ja00809a004>.

- (292) Hu, S.; Smith, K. M.; Spiro, T. G. Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (50), 12638–12646. <https://doi.org/10.1021/ja962239e>.
- (293) Oellerich, S.; Wackerbarth, H.; Hildebrandt, P. Spectroscopic Characterization of Nonnative Conformational States of Cytochrome c. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (25), 6566–6580. <https://doi.org/10.1021/jp013841g>.
- (294) Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N. T. Resonance Raman Investigation of Carbon Monoxide Bonding in (Carbon Monoxy)Hemoglobin and -Myoglobin: Detection of Iron-Carbon Monoxide Stretching and Iron-Carbon-Oxygen Bending Vibrations and Influence of the Quaternary Structure Change. *Biochemistry* **1982**, *21* (6), 1132–1140. <https://doi.org/10.1021/bi00535a004>.
- (295) Yamamoto, T.; Palmer, G.; Gill, D.; Salmeen, I. T.; Rimai, L. The Valence and Spin State of Iron in Oxyhemoglobin as Inferred from Resonance Raman Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248* (14), 5211–5213. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43692-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43692-2).
- (296) Ward, K. R.; Filho, I. T.; Barbee, R. W.; Torres, L.; Tiba, M. H.; Reynolds, P. S.; Pittman, R. N.; Ivatury, R. R.; Terner, J. Resonance Raman Spectroscopy: A New Technology for Tissue Oxygenation Monitoring*. *Critical Care Medicine* **2006**, *34* (3), 792–799. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000201898.43135.3F>.
- (297) Schelvis, J. P. M.; Berka, V.; Babcock, G. T.; Tsai, A. Resonance Raman Detection of the Fe–S Bond in Endothelial Nitric Oxide Synthase † , ‡. *Biochemistry* **2002**, *41* (18), 5695–5701. <https://doi.org/10.1021/bi0118456>.
- (298) Nicoletti, F. P.; Comandini, A.; Bonamore, A.; Boechi, L.; Boubeta, F. M.; Feis, A.; Smulevich, G.; Boffi, A. Sulfide Binding Properties of Truncated Hemoglobins. *Biochemistry* **2010**, *49* (10), 2269–2278. <https://doi.org/10.1021/bi901671d>.
- (299) Cortese-Krott, M. M.; Kuhnle, G. G. C.; Dyson, A.; Fernandez, B. O.; Grman, M.; DuMond, J. F.; Barrow, M. P.; McLeod, G.; Nakagawa, H.; Ondrias, K.; Nagy, P.; King, S. B.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K.; Singer, M.; Kelm, M.; Butler, A. R.; Feelisch, M. Key Bioactive Reaction Products of the NO/H₂S Interaction Are S/N-Hybrid Species, Polysulfides, and Nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1509277112>.
- (300) Everett, S. A.; Wardman, P. [5] Perthiols as Antioxidants: Radical-Scavenging Andprooxidative Mechanisms. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1995; Vol. 251, pp 55–69. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)51110-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)51110-5).
- (301) Dou, Y.; Olson, J. S.; Wilkinson, A. J.; Ikeda-Saito, M. Mechanism of Hydrogen Cyanide Binding to Myoglobin. *Biochemistry* **1996**, *35* (22), 7107–7113. <https://doi.org/10.1021/bi9600299>.
- (302) Rousseau, D. L.; Ching, Y. C.; Brunori, M.; Giacometti, G. M. Axial Coordination of Ferric Aplysia Myoglobin. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (14), 7878–7881.
- (303) Cerda, J.; Echevarria, Y.; Morales, E.; López-Garriga, J. Resonance Raman Studies of the Heme-Ligand Active Site of Hemoglobin I from *Lucina Pectinata*. *Biospectroscopy* **1999**, *5* (5), 289–301. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1999\)5:5<289::AID-BSPY4>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1999)5:5<289::AID-BSPY4>3.0.CO;2-X).
- (304) Brunori, M.; Amiconi, G.; Antonini, E.; Wyman, J.; Zito, R.; Rossi Fanelli, A. The Transition between ‘Acid’ and ‘Alkaline’ Ferric Heme Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1968**, *154* (2), 315–322. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(68\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(68)90045-7).
- (305) Marques, H.; Perry, C. Hemepeptide Models for Hemoproteins: The Behavior of -Acetylmicroperoxidase-11 in Aqueous Solution. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999**, *75* (4), 281–291. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00100-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00100-2).
- (306) Cox, R. P.; Hollaway, M. R. The Reduction by Dithionite of Fe(III) Myoglobin Derivatives with Different Ligands Attached to the Iron Atom. A Study by Rapid-Wavelength-Scanning

- Stopped-Flow Spectrophotometry. *Eur J Biochem* **1977**, 74 (3), 575–587. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11427.x>.
- (307) Román-Morales, E.; Pietri, R.; Ramos-Santana, B.; Vinogradov, S. N.; Lewis-Ballester, A.; López-Garriga, J. Structural Determinants for the Formation of Sulfhemeprotein Complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, 400 (4), 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.068>.
- (308) Arbelo-López, H. D.; Rodríguez-Mackenzie, A. D.; Roman-Morales, E. M.; Wymore, T.; López-Garriga, J. Charge Transfer and π to π^* Transitions in the Visible Spectra of Sulfheme Met Isomeric Structures. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122 (19), 4947–4955. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12393>.
- (309) Libardi, S. H.; Pindstrup, H.; Cardoso, D. R.; Skibsted, L. H. Reduction of Ferrylmyoglobin by Hydrogen Sulfide. Kinetics in Relation to Meat Greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61 (11), 2883–2888. <https://doi.org/10.1021/jf305363e>.
- (310) Rios-Gonzalez, B. B. Lactoperoxidase Catalytically Oxidize Hydrogen Sulfide via Intermediate Formation of Sulfheme Derivatives. *Redox Biochemistry and Chemistry* **8(5):100021** **2024**. <https://doi.org/10.1016/j.rbc.2024.100021>.
- (311) Sishta, B. P.; Mauk, A. G. Preparation of Sulfheme Derivatives from Reconstituted Myoglobins Lacking the Heme Vinyl Substituents. *Inorg. Chem.* **1987**, 26 (4), 622–624. <https://doi.org/10.1021/ic00251a027>.
- (312) Chatfield, M. J.; La Mar, G. N.; Balch, Alan. L.; Smith, K. M.; Parish, D. W.; LePage, T. J. Proton NMR Study of the Influence of Heme Vinyl Groups on the Formation of the Isomeric Forms of Sulfmyoglobin. *FEBS Letters* **1986**, 206 (2), 343–346. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81009-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81009-2).
- (313) Fernández, M.; Frydman, R. B.; Bari, S.; Frydman, B. Reconstitution of Apomyoglobin with Extended Biliverdins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, 183 (3), 1209–1215. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80319-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80319-5).
- (314) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Kampas, F.; Kim, J. On the Preparation of Metalloporphyrins. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1970**, 32 (7), 2443–2445. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(70\)80535-8](https://doi.org/10.1016/0022-1902(70)80535-8).
- (315) Giovanetti, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In *Macro to nano spectroscopy*; 2012; pp 87–108.
- (316) Moody, P. C. E.; Raven, E. L. The Nature and Reactivity of Ferryl Heme in Compounds I and II. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51 (2), 427–435. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00463>.
- (317) Kwon, H.; Basran, J.; Casadei, C. M.; Fielding, A. J.; Schrader, T. E.; Ostermann, A.; Devos, J. M.; Aller, P.; Blakeley, M. P.; Moody, P. C. E.; Raven, E. L. Direct Visualization of a Fe(IV)–OH Intermediate in a Heme Enzyme. *Nat Commun* **2016**, 7 (1), 13445. <https://doi.org/10.1038/ncomms13445>.
- (318) Kawamura-Konishi, Y.; Kihara, H.; Suzuki, H. Reconstitution of Myoglobin from Apoprotein and Heme, Monitored by Stopped-flow Absorption, Fluorescence and Circular Dichroism. *European Journal of Biochemistry* **1988**, 170 (3), 589–595. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13738.x>.
- (319) Wu, B.; Wu, Y.; Tang, W. Heme Catabolic Pathway in Inflammation and Immune Disorders. *Front. Pharmacol.* **2019**, 10, 825. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>.
- (320) Motterlini, R.; Foresti, R. Biological Signaling by Carbon Monoxide and Carbon Monoxide-Releasing Molecules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2017**, 312 (3), C302–C313. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2016>.
- (321) *Carbon Monoxide and Cardiovascular Functions*, 0 ed.; Wang, R., Ed.; CRC Press, 2001. <https://doi.org/10.1201/9781420041019>.

- (322) Xuan, L.; Li, J.; Wang, X.; Wang, C. Crosstalk between Hydrogen Sulfide and Other Signal Molecules Regulates Plant Growth and Development. *IJMS* **2020**, *21* (13), 4593. <https://doi.org/10.3390/ijms21134593>.
- (323) Marden, M. C.; Leclerc, L.; Poyart, C. Heme-CO as a Probe of the Conformational State of Calmodulin. *FEBS Letters* **1990**, *273* (1–2), 188–190. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81081-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81081-X).
- (324) De Villiers, K. A.; Kaschula, C. H.; Egan, T. J.; Marques, H. M. Speciation and Structure of Ferriprotoporphyrin IX in Aqueous Solution: Spectroscopic and Diffusion Measurements Demonstrate Dimerization, but Not μ -Oxo Dimer Formation. *J Biol Inorg Chem* **2007**, *12* (1), 101–117. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0170-1>.
- (325) Johnson, C. J.; Otto, R.; Continetti, R. E. Spectroscopy and Dynamics of the HOCO Radical: Insights into the $\text{OH} + \text{CO} \rightarrow \text{H} + \text{CO}_2$ Reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (36), 19091–19105. <https://doi.org/10.1039/C4CP02593H>.
- (326) Francisco, J. S.; Muckerman, J. T.; Yu, H.-G. HOCO Radical Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (12), 1519–1526. <https://doi.org/10.1021/ar100087v>.
- (327) Zhao, S.; Yan, S.; Liu, X.; Yang, L.; Sun, S.; Zhang, J. Effect of Water on Dynamics of HOCO Radical. *Chemical Physics* **2021**, *546*, 111173. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2021.111173>.
- (328) Smith, M. H. Kinetics and Equilibria in Systems Containing Haem, Carbon Monoxide and Pyridine. *Biochemical Journal* **1959**, *73* (1), 90–101. <https://doi.org/10.1042/bj0730090>.