

ESTUDIOS SOBRE LAS OXIDACIONES BIOLÓGICAS

VII.—LA OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO (VITAMINA C) EN LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS.

POR

E. S. GUZMÁN BARRÓN, ALBERTO GUZMAN BARRÓN,
FRIEDRICH KLEMPERER.

(Del Departamento de Medicina, Universidad de Chicago y de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Lima).

En un trabajo anterior (1), hemos demostrado que el ácido ascórbico (Vitamina C), disuelto en soluciones tampones a pH bajo 7, aunque no auto-oxidable, es realmente oxidado por el oxígeno atmosférico en presencia de mínimas trazas de cobre, que aún no pueden ser descubiertas por el reactivo de Koltoff (2). No obstante, en los tejidos y en ciertos fluidos biológicos el ácido ascórbico está presente sobre todo en su forma reducida VAN ECKELM, EMMERIC, WOLF (3), BACHARACH COCK y SMITH (4), BESSEY y KING, (5), y GABE (6), aunque el cobre es encontrado allí en cantidades dosables. En éstos fluidos existe un mecanismo inhibitorio que protege el ácido ascórbico de la oxidación. Hay, sin embargo, otros fluidos biológicos, la mayor parte de origen vegetal, que oxidan el ácido ascórbico a una velocidad medible, fluidos en los que han sido señalados la presencia de "enzimas" que oxidan el ácido ascórbico SZENT-GYORGHYI (7), ZILVA (8), TAUBER, KLEINER y MISHKIND (9). La velocidad de oxidación del ácido ascórbico en estas dos clases de fluidos biológicos y el efecto de inhibidores específicos han sido estudiados en un empeño de comprender el mecanismo de producción de la acción protectora contra la oxidación del ácido ascórbico en aquellos flui-

dos pertenecientes al primer grupo, tanto como para descubrir en aquellos fluidos pertenecientes al segundo grupo, los catalistas que oxidan el ácido ascórbico.

METODO EXPERIMENTAL.

En estos experimentos, como en los anteriores (1), el mismo cuidado fué tomado para evitar la contaminación de los fluidos por metales pesados. La oxidación del ácido ascórbico fué determinada, en unos vasos de Warburg modificados, unidos al manómetro de Barcroft, midiéndose el consumo de oxígeno a 37° en el caso de fluidos de origen animal y a 25° en los de origen vegetal. Los fluidos fueron colocados en el vaso principal, las soluciones de ácido ascórbico en el depósito situado en el brazo del vaso. Cuando el equilibrio de la temperatura fué alcanzado, los fluidos fueron mezclados y la velocidad de oxidación del ácido ascórbico fué seguido. La oxidación del ácido ascórbico en el suero sanguíneo (a pH 7.39) y en el líquido cefalo-raquídeo (a pH 7.20), fué llevado a cabo en una mezcla de gases conteniendo 95% de O₂ y 5% de CO₂. El termobarómetro contenía los fluidos sin ácido ascórbico. El contenido de cobre de los fluidos fué determinado por el método de FISCHER y LEOPOLDI (10). Las determinaciones del pH fueron efectuados por el gas electrodo. El ácido ascórbico y el glutathion fueron obtenidos de la casa Hoffman-La Roche. Las soluciones tampones fueron preparadas libres de hierro y cobre.

LA OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POSEYENDO UN PODER INHIBITORIO.

DE CARO y GIANI (11) señalaron que los tejidos animales y los extractos de tejidos, protegían la oxidación del ácido ascórbico y sugirieron que el glutathion podría actuar como el inhibidor de esta oxidación. Esta sugestión ha encontrado apoyo en los recientes experimentos de MAWSON (12). Las condiciones no fisiológicas de estos experimentos son claros; el tejido animal fué molido, algunas veces tratado con ácidos fuertes, y la oxidación del ácido ascórbico fué determinada en extractos de tales tejidos. En los experimentos que aquí

CUADRO I

OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POSEYENDO MECANISMO INHIBIDOR

Cantidad de ácido ascórbico añadido, 0.02 mM. Temp., 37° en fluidos de origen animal y 25° en fluidos de origen vegetal.

Fluido	Concentración de Cu en el fluido <i>m/ Átomos/L</i>	Concentración de CuCl ₂ añadido <i>m/ Átomos/L</i>	pH	Tiempo para la oxidación media <i>minutos</i>
Suero sanguíneo (hombre)	2.93 × 10 — 2	7.42	294 (calc) 32.6 mm ³ de O ₂ consumido en 60 minutos
"	2.52 × 10 — 2	7.28 × 10 — 2	8.50	148.6
"	1.89 × 10 — 2	7.20	115.6
Sangre total (perro)	216.8 (calc) 33.8 mm ³ de O ₂ consumidos en 60 minutos.
Líquido cefalo-raquídeo (hombre)	5.03 × 10 — 2	7.33	1900 (calc) 7.7 mm ³ de O ₂ consumidos en 60 minutos.
"	"	7.28 × 10 — 2	8.26	149.5
"	"	7.30	46.1
Orina (hombre)	7.06 × 10 — 3	5.42	787 (calc) 9.3 mm ³ de O ₂ consumidos en 60 minutos.
"	"	7.27 × 10 — 2	"	31.8
Saliva (hombre)	?	7.38	30.
Jugo gástrico (hombre)	?	4.52	No hubo oxidación en 120 minutos
Humor vitreo (buey)	2.35 × 10 — 3	8.41	125.4
"	"	7.28 × 10 — 2	"	20.4
Leche (vaca)	2.35 × 10 — 3	6.54	No hubo oxidación en 60 minutos
"	"	7.28 × 10 — 2	"	275.4 (calc) 31 mm ³ de O ₂ en 70 m.
"	"	7.28 × 10 — 1	"	41.1
Jugo de naranja	1.26 × 10 — 2	3.66	No hubo oxidación en 60 minutos.
"	"	7.28 × 10 — 2	"	340 (calc) 21.5 mm ³ de O ₂ en 60 m.
Jugo de tomate	9.45 × 10 — 3	4.50	No hubo oxidación en 60 minutos.
"	"	7.28 × 10 — 2	"	948 (calc) 10.3 mm ³ de O ₂ en 60 m.
Jugo de berros	7.09 × 10 — 3	3.18	No hubo oxidación en 60 m.
"	"	7.28 × 10 — 2	"	134.3 (calc) 53.6 mm ³ de O ₂ consumidos en 60 minutos.

relatamos, la oxidación del ácido ascórbico añadido fué seguido en fluidos biológicos normales con y sin adición de $CuCl_2$. Entre los fluidos de origen animal los siguientes fueron empleados: suero sanguíneo, líquido cefalo-raquídeo, orina, saliva, jugo gástrico, todos ellos de hombre; sangre total de perro, humor vitreo del ojo de buey, leche de vaca. Entre aquellos de origen vegetal: jugos de naranja, de tomate, y de toronja. En el cuadro I se encuentra la velocidad de oxidación de estos fluidos. En ausencia del catalista que se añade todos estos fluidos biológicos protegieron a variados grados la oxidación de ácido ascórbico añadido, la protección siendo completa en el caso del jugo gástrico, leche y jugos de naranja, tomate y toronja. Es de interés notar la similitud en la velocidad de oxidación del ácido ascórbico en el suero sanguíneo y en la sangre total, lo que demuestra que la presencia de los glóbulos rojos no tiene influencia sobre esta oxidación. Con el fin de determinar el poder protectivo de éstos fluidos contra la oxidación del ácido ascórbico añadido, la concentración del cobre en estos fluidos fué determinado por el método de FISCHER y LEOPOLDI. El poder protectivo fué obtenido dividiendo el tiempo requerido para la oxidación media del ácido ascórbico (en minutos) en el líquido biológico por el requerido en una solución tamponada a idéntico pH y similar concentración de cobre, desde que estos dos factores tienen un importante rol en la oxidación del ácido ascórbico. Además, el poder protectivo normal, el poder de proteger el ácido ascórbico de la oxidación por el $CuCl_2$ añadido fué también determinado (Cuadro II). El suero sanguíneo, leche, y jugo de tomate tuvieron en alto grado el mas grande poder protectivo contra el $CuCl_2$ añadido; la orina, saliva y jugo de toronja en menor grado.

Indudablemente la propiedad de estos fluidos de proteger el ácido ascórbico de la oxidación es debido, como lo sugirió MAWSON (12) a variados factores inhibitorios. De estos factores el mas importante debe ser aquel concerniente con la inhibición del poder catalítico del cobre, desde que el cobre está presente en todos los fluidos biológicos en una concentración suficiente para producir una rápida oxidación del ácido ascórbico (LONDON, ELVEHJEM PETERSON (13). Esta acción catalítica del cobre puede ser disminuída por la formación de complejos de cobre no ionizable, tales como aquellos formados con proteínas (LITTSCH, SACHSE Y BECK (14), y con un número de ácidos animados (BORSOOK Y TILLMANN (15). Como un

CUADRO No. II

EL PODER PROTECTIVO DE LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS CONTRA LA OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO

Poder protectivo = tiempo para la oxidación media del ácido ascórbico añadido a los fluidos biológicos (en minutos), dividido por el tiempo requerido para la oxidación media en una solución tampón de idéntico valor en pH y concentración en Cu.

Fluido	Poder protectivo	
	Normal	Contra el CuCl ₂ añadido (7.28x10 ⁻² mM L)
Suero sanguíneo (hombre)	18.6	12.7
Sangre total (perro)	15.5
Líquido cefalo-raquídeo(hombre)	22.0	6.6
Orina (hombre)	16.2	1.7
Saliva (hombre)	39.6*	2.7
Jugo gástrico (hombre)	Completo
Humor vitrio (del ojo de buey)	7.3	2.
Leche (de vaca)	Completo	22.9
Jugo de naranja	"	8.7
Jugo de tomate	"	25.2
Jugo de toronja	"	2.6

* La cantidad de cobre en la saliva no fué determinada. Para obtener el poder protectivo fué supuesto que la concentración de cobre en la saliva fué similar a la del suero sanguíneo.

ejemplo de tal inhibición damos en la figura 1 la velocidad de oxidación del ácido ascórbico por el CuCl_2 (0.0002 mM) como catalista a un pH 6.34 con o sin ovoalbúmina (8% y glicina)

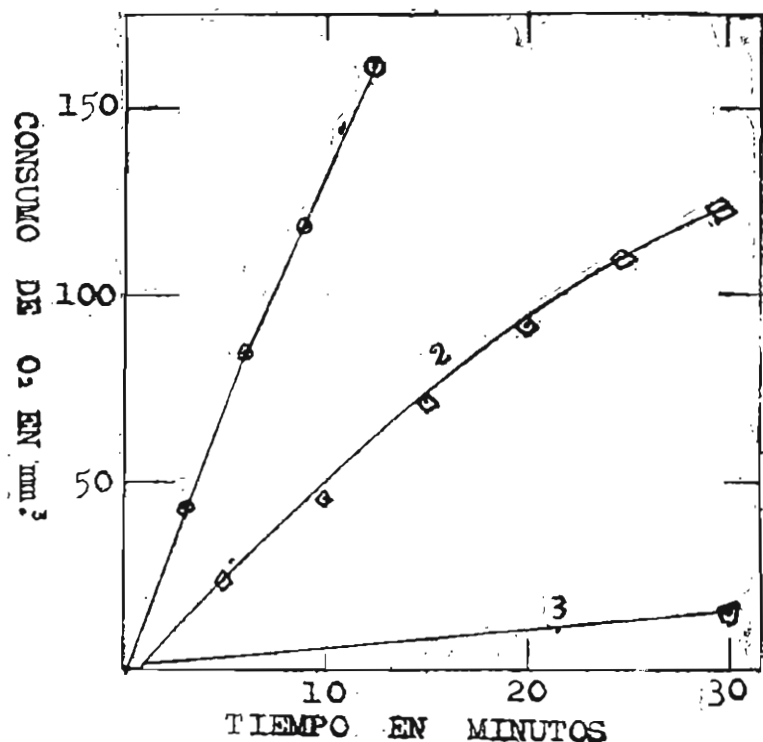


Figura 1.

El efecto de las proteínas y de los ácidos animados sobre la oxidación del ácido ascórbico por el CuCl_2 (0.0002 mM). Cantidad de ácido ascórbico: 0.02 mM. pH 6.34. Temperatura 25°. 1 Fosfato tampón mas CuCl_2 . 2 Fosfato tampón mas CuCl_2 mas glicina. (0.1Mpor litro). 3. Fosfato tampón mas CuCl_2 mas ovoal búmina (6%).

(0.1 M de glicina) fué añadido, una concentración que, de acuerdo con BORSOOK Y TILLMAN es mas que suficiente para guardar el cobre enteramente no ionizable.) La adición de ovoalbúmina al tampón fosfato produjo 92.5% de inhibición, y la adición de glicina, 64% de inhibición. Un agente mas potente de inhibición de la acción catalítica del cobre ha sido encontrado en el glutatión. Este efecto inhibitor del gluta-

tion había sido ya observado por DE CARO Y GIANI (11), BERSIN, KOSTER Y JUSATZ (16), MAWSON (12), pero no se encontró satisfactoria explicación. Fué sostenido que la inhibición era debido al poder de reducción del glutathion mas fuerte que el del ácido ascórbico. Los experimentos indicados en el Cuadro III parecen indicar que esta inhibición es debida mas bien a la fuerte afinidad del glutathion para el cobre, con la formación de un complejo cobre-glutathion (ya descrito dicho complejo por HOPKINS (17). En este experimento 0.01 mM de ácido ascórbico fué oxidado en una solución tampón de fosfato a pH 6.34, con $CuCl_2$ como catalista, y la velocidad de oxidación fué comparada con aquella de idéntica solución conteniendo variadas proporciones de glutathion. Algunos experimentos fueron llevados a cabo a un pH 7.34 con resultados similares. Como puede ser vista en el Cuadro III, no es la relación ácido ascórbico : glutathion que determina el poder inhibitorio del glutathion, sino la relación $CuCl_2$: glutathion. El poder inhibitorio fué completo tanto como allí existía mas de una molécula de glutathion por átomo de cobre. De acuerdo con HOPKINS el complejo glutathion-cobre contiene un átomo de cobre por molécula de glutathion. Cuando tal relación fué alcanzada hubo una ligera oxidación del ácido ascórbico (90% de inhibición), cuando la relación de cobre ; glutathion fué de 5 : 1 la inhibición fué solamente de 10%, haciéndose nula cuando la relación fué 50 : 1. Desde que una relación del cobre : glutathion de 1 : 2 es bastante para producir la completa inhibición de la oxidación del ácido ascórbico por el cobre, una concentración de glutathion de 0.054 mM por litro (16.6 mgs. por litro) prevendría enteramente la oxidación del ácido ascórbico en la sangre, porque la concentración del cobre en la sangre es aproximadamente de 0.027 miliátomos por litro. Sería posible determinar la constante de ionización del complejo cobre-glutathion por el grado de inhibición sobre la oxidación del ácido ascórbico sobre el cobre iónico.

Podemos por lo tanto concluir que, el glutathion, proteínas, y ácidos animados (por la formación de complejos cobre no-ionizable), son los más importantes mecanismos para la protección del ácido ascórbico de la oxidación en aquellos fluidos biológicos que poseen tal acción inhibitoria.

CUADRO III

**EL EFECTO DEL GLUTATION SOBRE LA OXIDACION
DEL ACIDO ASCORBICO CON EL CuCl_2
COMO CATALISTA**

Cantidad del acido ascórbico, 0.01mM. pH 6.34 (tampón fosfa-
to) Temperatura 25°.

Inhibición calculada por comparación de la velocidad de oxi-
dación del acido ascórbico en tampón fosfato mas CuCl_2 con
la velocidad de oxidación en la misma solución mas glutathion.

Cantidad de glutathion reducido	Cantidad de CuCl_2	Inhibición
mM	mM	%
0.01	0.0002	Completa
0.01	0.0001	"
0.005	0.00005	"
0.0005	"	"
0.0002	"	"
0.0001	"	"
0.00005	"	90
0.00001	"	10
0.000001	"	Ninguna

LA OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO POR FLUIDOS QUE NO POSEEN MECANISMO INHIBITORIO.

En 1931 SZENT GYORGY, (7) señaló la presencia en el jugo de col de una "enzima" que oxidaba el ácido ascórbico; ZILVA (8) encontró la "enzima" en el jugo de manzana; y TAUBER KLEINER y MISHKIND (9) en el jugo de zapallo de la calidad Hubbar. Como el ácido ascórbico es inmediatamente oxidado por un número de sistemas de oxidación y reducción reversibles de adecuado potencial (tal como el cobre, hemocromógenos y un grupo de colorantes de origen vegetal), podría ser sospechado que la llamada "oxidasa del ácido ascórbico" sería encontrado en una variedad de fluidos biológicos, sobre todo en aquellos que no tengan un mecanismo inhibitor. La reversibilidad de tales oxidaciones, observada por ZILVA, no es atribuible a la "enzima" sino a una propiedad del ácido ascórbico oxidado a valores de pH de los experimentos de ZILVA, como fué demostrado anteriormente en este laboratorio. (1).

Como ejemplos representativos de éste grupo de fluidos biológicos fueron seleccionados jugos vegetales extraídos de manzanas, melocotones, col, zapallos y berros. Debido al bajo poder tampón de estos fluidos, el ácido ascórbico fué previamente neutralizado con Na_2CO_3 tanto que la oxidación fué llevada a cabo sin alterar la concentración en iones hidrógeno de los fluidos biológicos. Como puede ser observado en el Cuadro IV el jugo de zapallo amarillo oxida al ácido ascórbico más rápidamente que todos los otros fluidos examinados, la oxidación media habiendo sido alcanzada en 16.6 minutos. A éste valor de pH y concentración de cobre la oxidación media del ácido ascórbico en una solución tamponada de fosfato fué alcanzada en 30.8 minutos. La velocidad de oxidación no correspondió ni al valor del pH, como tampoco a la concentración de cobre.

Con el fin de determinar los catalistas responsables para la oxidación del ácido ascórbico en estos fluidos, dos específicos inhibidores fueron estudiados: el HCN, que inhibe la oxidación producida por los hemocromógenos; y el 3-hidroxiquinolina que inhibe aquella producida por el cobre, el efecto inhibitorio de estas sustancias habiendo sido previa-

CUADRO IV

**OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO NO POSEYENDO
MECANISMO INHIBIDOR**

Cantidad de acido ascórbico añadido, 0.02 mM.
Temperatura 25°

Fluido	pH	Concentración del Cu en el fluido	Oxidación media Tiempo
		<i>mAtomos/L</i>	<i>minutos</i>
Jugo de manzana	4.25	1.24×10^{-2}	43.9
Jugo de col	5.10	9.44×10^{-2}	35.4
Jugo de zapallo amarillo	5.94	8.03×10^{-3}	16.6
Jugo de lechuga	5.42	6.30×10^{-3}	22.3
Jugo de melocotón	3.76	1.73×10^{-2}	35.0
Jugo de berros	4.62	6.75×10^{-3}	45.7

mente establecido en soluciones tampones conteniendo CuCl_2 , cobre-glicina y hemocromógeno ferri-nicotina como catalistas, El HCN a una concentración de 0.005M por litro produjo una inhibición de 58% sobre la oxidación del ácido ascórbico por el hemocromógeno, mientras que el 8-hidroxiquinolina no tuvo efecto, la acción catalítica del cobre fué completamente inhibida por ambos reactivos. Por el uso de estos inhibidores fué descubierto que la oxidación producida por el jugo de col, zapallo amarillo, y berros no fué debida a la acción catalítica del cobre porque la velocidad de oxidación fué idéntica con y sin 8-hidroxiquinolina. Por otra parte la oxidación del jugo de manzanas, lechuga y melocotones, fué encontrado ser parcialmente debido al cobre, como lo demuestra la parcial inhibición producida por el 8-hidroxiquinolina. El HCN (0.005M) inhibe en una grande proporción (90%) la oxidación producida por el jugo de zapallo amarillo.

y solamente en un 50% la oxidación por el jugo de col. La adición de CuCl_2 (0.0002mM) al jugo de col no aumentó apreciablemente la velocidad de oxidación (Figura No. 2).

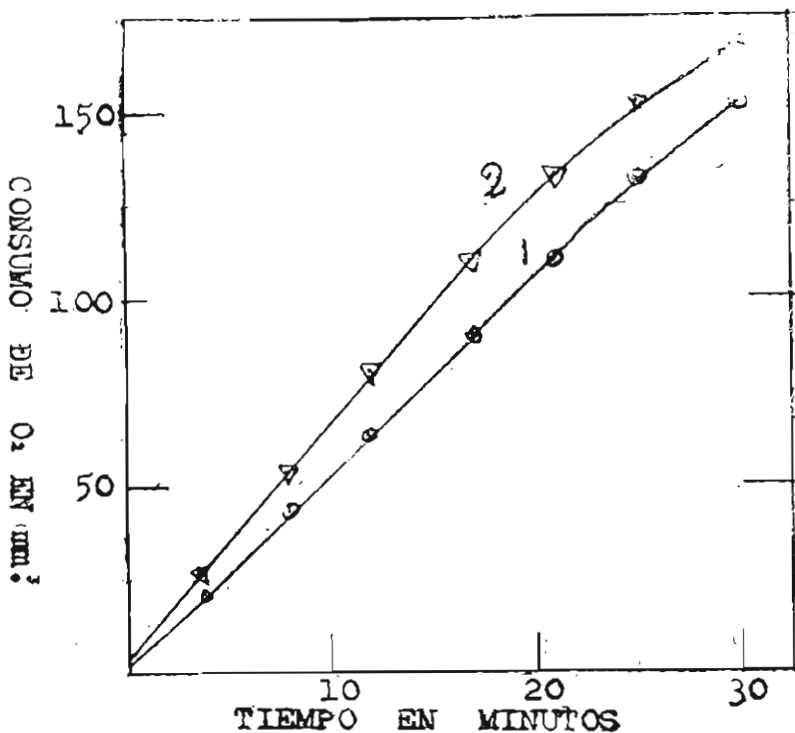


Fig. 2.

La oxidación del ácido ascórbico por el jugo de lechuga. Cantidad de ácido ascórbico: 0.02 mM . pH. 5.42 Temp. 25° . 1, jugo de lechuga. 2, Jugo de lechuga mas CuCl_2 (0.0002 mM).

Ha sido demostrado previamente que el glutathion inhibe la oxidación del ácido ascórbico por el cobre como catalista. Desde que la inhibición depende de la relación cobre : glutathion ha sido concluído que el efecto era específico para la oxidación del ácido ascórbico por el cobre como catalista. Esta conclusión encuentra mayor apoyo en los experimentos

CUADRO V.

**EFFECTO DEL HCN Y DEL 8-HIDROXIQUINOLINA
SOBRE LA OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO
EN FLUIDOS BIOLÓGICOS NO POSEYENDO MECA-
NISMO INHIBIDOR.**

Temperatura 25°.

FLUIDO	pH	Inhibición por ciento	
		HCN 0.005 M/L	8-hidroxi- quinolina. c. a 0.002 M/L.
Tampón fosfato mas CuCl ₂ 0.0002 mM.....	6.34	Completa	Completa
Tampón mas 0.1 M. glicina mas CuCl ₂ , 0.0002 mM.....	6.34	„	„
Tampón fosfato mas he- mocromógeno ferri- nicotina.....	6.87	58.4	Nula
Jugo de manzanas.	4.25	67.4	41.0
Jugo de col.	5.10	52.8	Nula
Jugo de zapallo amarillo	5.94	92.4	„
Jugo de lechuga.	5.42	58.4	43.9
Jugo de melocotón.	3.76	61.4	42.8
Jugo de berros.	4.62	88.4	Nula

señalados en la Figura No. 3, en que el efecto del glutatión sobre la oxidación del ácido ascórbico por el jugo de zapallo amarillo y por el tampón fosfato conteniendo el hemocromógeno ferri-nicotina fué estudiado. En ambos el glutatión falló de inhibir la oxidación. En el caso del zapallo amarillo la ve-

locidad con y sin el glutathion fué idéntica (el zapallo amarillo no oxida al glutathion); en el caso del hemocromógeno ferril nicotina, la velocidad de oxidación en presencia del glutathion fué ligeramente más grande, probablemente debido a una baja de oxidación del glutathion, añadido a la oxidación de ácido ascórbico.

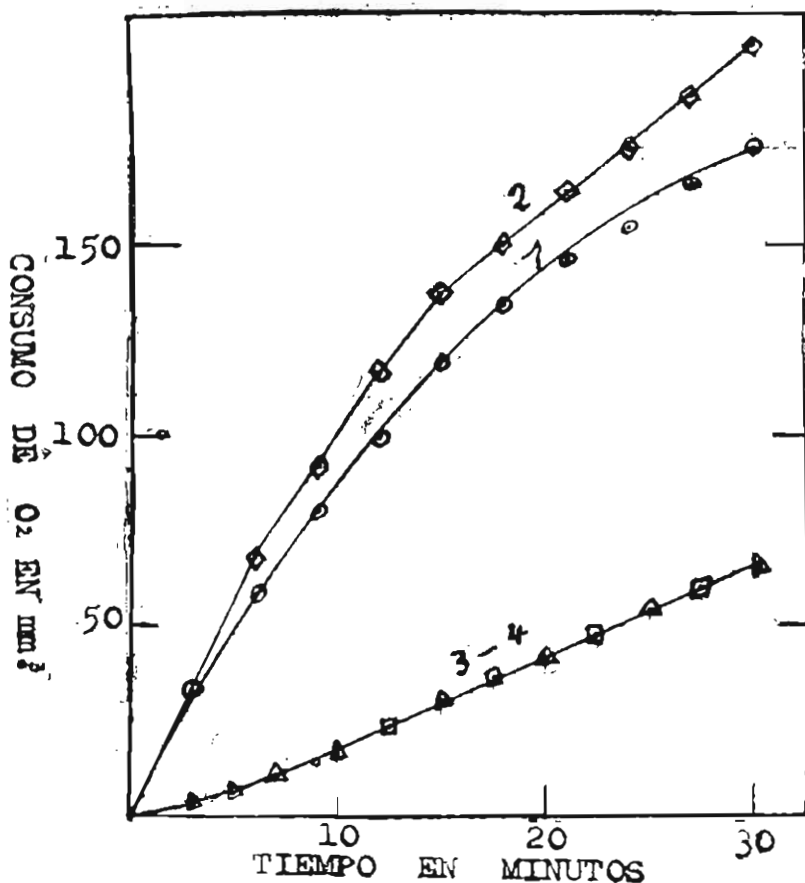


Figura 3.

El efecto del glutathion sobre la oxidación del ácido ascórbico por el zapallo amarillo y tampón fosfato mas hemocromógeno ferril-nicotina. 1, Hemocromógeno ferril-nicotina (hemina, 0.00015 mM); nicotina (0.01 mM). 3, Zapallo amarillo. 4, Zapallo amarillo mas glutathion (0.0005 mM).

Es por lo tanto, completamente probable que los hemocromógenos son los principales catalistas para la oxidación del ácido ascórbico en estos fluidos biológicos que no poseen mecanismo inhibitor.

RESUMEN

Los fluidos biológicos pueden ser divididos de acuerdo con su conducta hacia el ácido ascórbico en dos grupos: aquellos poseyendo un mecanismo inhibitor que protege al ácido ascórbico de la oxidación, y aquellos desprovistos de este mecanismo.

Fluidos de origen animal y algunos de origen vegetal, (aquellos conteniendo cantidades dosables de ácido ascórbico) corresponden al primer grupo. El ácido ascórbico es protegido de la oxidación en dichos fluidos por la acción del glutathion, proteínas, ácidos aminados, que inhiben la acción catalista del cobre. Los fluidos de origen vegetal (aquellos que contienen muy poco ácido ascórbico) corresponden al segundo grupo. El ácido ascórbico es oxidado en estos fluidos por una variedad de catalistas oxidantes, cobre y hemocromógenos, como lo prueba el efecto de los inhibidores. El efecto inhibitorio del glutathion es específico para la acción catalítica del cobre, y no tiene acción sobre la velocidad de oxidación del ácido ascórbico por el hemocromógeno ferri-nicotina o por el jugo de zapallo amarillo.

- 1.—GUZMÁN BARRÓN E. S., DE MEIO R. H., Y KLEMPERER F., *J. Biological Chem.* 112, 625 (1936).
- 2.—KOLTHOFF I. M., *J. Am. Chem. Soc.* 52, 222 (1930).
- 3.—VAN ECKELEM M., EMMERIC A. Y WOLF L. K., *Klin. Woch.* 13, 564. (1934).
- 4.—BACHARACH A. L., COOK P. M., Y SMITH E. L., *Biochem J.*, 28, 1393 (1934).
- 5.—BESSEY C. A., Y KING C. G., *Jour. Biolog. Chem.*, 103, 687 (1933).
- 6.—GABBE E., *Klinich Woch.*, 13, 1389, (1934).
- 7.—SZENT GYORGHYI A., *J. Biolog. Chem.*, 90, 385 (1931).
- 8.—ZILVA S. S., *Biochem J.* 28, 663 (1934).
- 9.—TAUBER H. KLEINER I. S., Y MISHKIND D., *J. Biolog. Chem.* 110, 211 (1935).
- 10.—FISCHER H., Y LEOPOLDI G., *Angew Chem*, 47, 90 (1934).
- 11.—DE CARO L., Y GIANI M., *Z. Physiolo. chem.* 228, 13 (1934).
- 12.—MAWSON C. A., *Biochem J.*, 29, 569 (1935).
- 13.—LINDOW C. W., ELVEHJEM C. A., Y PETERSON W. H., *J. Biolog. Chem.* 82, 465 (1929).
- 14.—ETTISCH G., SACHSE H. Y BECK W. *Biochem Z.* 230, 68, (1931).
- 15.—BORSOOK H., Y TILLMANN K. V., *J. Biolo. Chem.* 98, 671 (1932).
- 16.—BERSIN TH., KÖSTER H. Y JUSATZ H. J., *Z. physiol. chem.*, 235, 12 (1935).
- 17.—HOPKINS F. G., *J. Biolog. Chem.*, 84, 269 (1929).