

## Cinética de Autooxidación del Ascorbato por Iones Cúpricos

LUZMILA TRONCOSO, EMILIO GUIJA

*Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina.  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*

### RESUMEN

La autooxidación del ascorbato catalizada por  $\text{Cu}^{2+}$  se realiza a través de una reacción de primer orden, proceso que es dependiente de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  y que obedece a una cinética de saturación. Ello sugiere que en la secuencia catalítica se formaría un complejo intermedio que limitaría la formación de los productos de la reacción, uno de los cuales es el radical libre hidroxilo. La tiourea inhibe notablemente la reacción de autooxidación, mientras que el glicerol no ejerce efecto alguno. El ascorbato y el  $\text{Cu}^{2+}$ , utilizados en las concentraciones en que se produce la autooxidación, no escinden el puente disulfuro del DTNB. La histidina y el citrato inhiben tanto la reacción de autooxidación como la ruptura del enlace disulfuro del DTNB. Estos resultados sugieren que la ruptura del puente disulfuro del DTNB se realizaría con intervención de los radicales libres hidroxilo, generados por el sistema ascorbato/ $\text{Cu}^{2+}$ , y paralelamente mediante un proceso de reducción o de hidrólisis.

*Palabras claves: Ácido Ascórbico; Cobre; Radicales Libres; Óxido-Reducción; Antioxidantes.*

### KINETIC OF ASCORBATE-AUTOOXIDATION BY CUPRIC IONS

#### SUMMARY

Ascorbate autooxidation catalized by  $\text{Cu}^{2+}$  occurs through a  $\text{Cu}^{2+}$ -concentration-dependent first order reaction, which fulfill saturation kinetic rules. It suggests that could be an intermedial complex synthetized in the catalitic sequence, which probably limits the formation of reaction-products (v. g., free radical hydroxil, and others). Autooxidation reaction is strongly inhibited by thiourea, while glicerol have no effects on it. Disulfure-binding on DNTB was not broken by ascorbate and  $\text{Cu}^{2+}$ , used in the same concentrations which occurs in autooxidation process. Histidine and citrate inhibits both autooxidation reaction and DNTB-disulfure binding break. These results suggests that the DNTB-disulfure binding-break was mediated by Ascorbate/ $\text{Cu}^{2+}$  system-generated hydroxil free radicals, as well as through a reduction process or hydrolisis.

*Key words: Ascorbic Acid; Copper; Free Radicals; Oxidation-Reduction; Antioxidants.*

## INTRODUCCIÓN

El ascorbato es una vitamina que se encuentra ampliamente distribuída en frutas y verduras (<sup>1,2</sup>), pero no

es sintetizado por el hombre, por cuyo motivo es imprescindible que lo incluya en su dieta (<sup>3</sup>).

Existen diversos estudios que atribuyen al ascorbato un papel fundamental en las reacciones de hidroxilación, como un enérgico agente reductor biológico y con papeles bien definidos en la síntesis de carnitina y esteroides. La absorción de hierro no hem, la formación de colágeno, la función inmune y el metabolismo de nucleótidos cíclicos, aminoácidos, colesterol, glucosa y ácido fólico (<sup>4-7</sup>).

#### Correspondencia:

*Dra. Luzmila Troncoso.  
Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición.  
Facultad de Medicina. U.N.M.S.M.  
Apartado Postal N° 1546 Lima - Perú.*

El ácido ascórbico en presencia de trazas de metales de transición, como el  $\text{Cu}^{2+}$ , genera radicales hidroxilo a través de un proceso de autooxidación (8). La presencia de EDTA inhibe esta reacción, debido a que forma un complejo con el  $\text{Cu}^{2+}$  (8). Cuando el ascorbato se encuentra en presencia de una concentración micromolar de  $\text{Cu}^{2+}$ , incrementa considerablemente la oxidación de diversos compuestos biológicamente importantes, tales como las proteínas (9-11), polisacáridos (12) y ácidos nucleicos (13,14).

La lipoperoxidación es estimulada cuando el ácido ascórbico se encuentra en presencia de sales de cobre o hierro, reacción que se produce con la formación de especies reactivas como son los radicales libres hidroxilo; pero en contraposición a ello, el ascorbato tiene la capacidad de conferir una eficiente protección contra la peroxidación lipídica (15,16) y en ese contexto puede restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E oxidada, lo que podría constituirse en una de las funciones más importantes de esta vitamina (17). La formación de peróxido de hidrógeno que se observa en el ojo es muy probable que se cleve debido a la oxidación no enzimática del ascorbato (18).

El efecto que eventualmente puede ejercer el ascorbato es dependiente de su concentración, y en tal sentido puede comportarse como un eficiente antioxidante o en su defecto actuar como un prooxidante (19,20). Cuando las concentraciones de ascorbato se encuentran por encima de 1 mmol, actúa como un prooxidante en presencia de metales de transición, tales como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (21,22).

Esta vitamina tiene la propiedad de reducir los puentes disulfuro de compuestos de origen biológico, así como de aquellos obtenidos por síntesis. La reducción del ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) por el sistema ascorbato/ $\text{Cu}^{2+}$ , se incrementa considerablemente en presencia de cistina (23), en cambio, la presencia de superóxido dismutasa o catalasa ocasiona una disminución considerable de la ruptura del puente disulfuro del DTNB (6). En el presente trabajo se describe el proceso cinético de autooxidación del ascorbato y la probabilidad de que la ruptura de puentes disulfuro se realice exclusivamente por acción de radicales libres.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Materiales

En el manejo experimental se utilizaron ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) e histidina (Sigma

Chemical Company), fosfato monopotásico, glicerol, citrato, sulfato de cobre (E. Merck Darmstadt), ácido ascórbico y tiourea (Riedel de Haen). Todas las soluciones se prepararon con agua bidestilada en vidrio.

### Métodos

#### Reacción de autooxidación

Las soluciones de ascorbato y las de DTNB se prepararon inmediatamente previas a la ejecución de cada experimento. La autooxidación del ascorbato se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 265 nm (24) utilizando para los cálculos un coeficiente de extinción molar de  $19\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , valor que obtuvimos experimentalmente en nuestro laboratorio. El medio de reacción contenía, en un volumen final de 3.0 mL, tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0, ascorbato ( $3,3 \times 10^{-5}\text{ M}$ ) y concentraciones diversas de  $\text{Cu}^{2+}$  u otras sustancias motivo de experimentación. La reacción se realizó a temperatura ambiente y se inició mediante la adición del  $\text{Cu}^{2+}$ , la modificación de la absorbancia se midió en un graficador acoplado a un espectrofotómetro Gilford modelo 240.

#### Ruptura del enlace disulfuro

El ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) es un compuesto que por escisión de su puente disulfuro libera tionitrobenzoato que absorbe a 412 nm (25). El medio de ensayo contenía en un volumen de 2.0 mL, tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0, ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) 1 mM y concentraciones variables de ascorbato y  $\text{Cu}^{2+}$ . La liberación del tionitrobenzoato se midió a 412 nm en un espectrofotómetro Gilford modelo 240 acoplado a un graficador, y se cuantificó utilizando un coeficiente de extinción molar de  $13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS

El ascorbato es una vitamina que en medio acuoso y en presencia de oxígeno sufre un proceso de autooxidación que es acelerado a pH alcalino por metales de transición. La autooxidación del ascorbato se siguió midiendo la disminución de la absorbancia a 265 nm en un medio de reacción ajustado a pH 8.0 al que se le adicionó concentraciones diferentes de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . La autooxidación del ascorbato en ausencia de los metales de transición antes mencionados, fue muy baja.

En la Tabla N° 1 se observa que el ascorbato se autooxida en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en un grado notablemente mayor que cuando se utilizaron los metales  $\text{Co}^{2+}$

o  $Fe^{3+}$ . los que, en concentraciones dos veces mayores que el  $Cu^{2+}$ , produjeron una muy discreta autooxidación del ascorbato.

**Tabla N° 1.-** Autooxidación del ascorbato en presencia de metales de transición. \*

Metal	Concentración	(nm/min)
$Cu^{2+}$	33,33 $\mu$ mol	35.17
$Co^{2+}$	66,30 $\mu$ mol	0,83
$Fe^{3+}$	66.30 $\mu$ mol	0,42

\* El medio de ensayo contenía: tampón fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, ascorbato 33  $\mu$ M y los metales en las concentraciones indicadas.

El efecto ocasionado por el  $Cu^{2+}$  se pudo observar al utilizar concentraciones de este metal comprendidas entre 3,33 y 13,4  $\mu$ M, este proceso se realiza a través de una reacción de primer orden. Cuando se grafican las constantes de velocidad de primer orden en función de las concentraciones de  $Cu^{2+}$ , se observa que esta dependencia no es lineal, sino que corresponde a una curva de naturaleza hiperbólica, resultado que sugiere una cinética de saturación, tal como se muestra en la Fig. N° 1, donde es posible apreciar que el valor máximo de la concentración de  $Cu^{2+}$  que hemos utilizado para calcular la constante de velocidad corresponde a 0,0134 mM. La regraficación de los resultados anteriormente obtenidos en doble recíproca permite obtener una recta, lo que indicaría que la generación de radicales libres es saturable con respecto a la concentración de  $Cu^{2+}$ . de lo que también se desprende el hecho que durante el proceso de autooxidación se forme un complejo intermedio.

Estos resultados se ajustarían a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{k'} = \frac{Kd}{k_2 [X]} + \frac{1}{k_2}$$

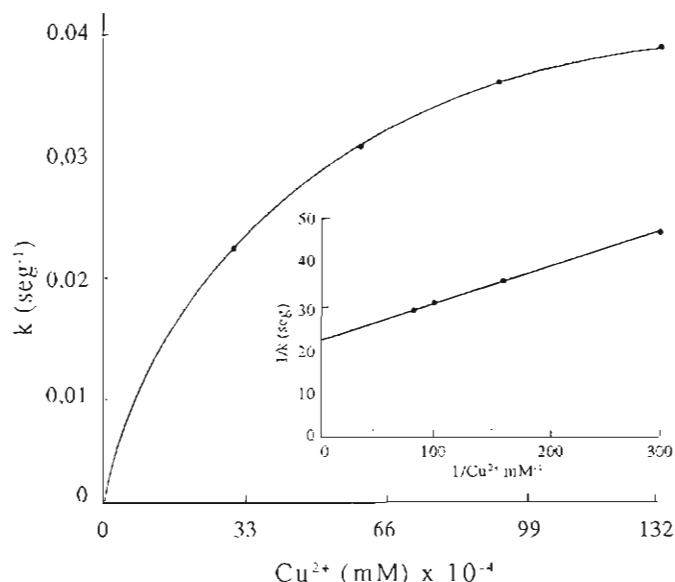
donde:

$k'$  = constante de velocidad observada.

$Kd$  = constante aparente de disociación del complejo intermedio.

$X$  = complejo intermedio.

$k_2$  = constante de velocidad de primer orden en la saturación.

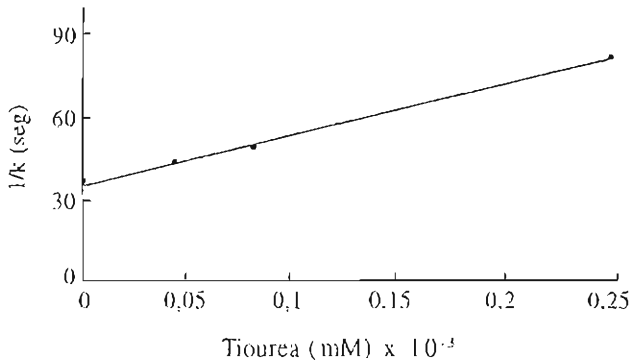


**Fig. N° 1.-** Efecto de la concentración de  $Cu^{2+}$  sobre la autooxidación del ascorbato. Medio de reacción: Tampón fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, ascorbato 0,033 mM y  $Cu^{2+}$  en concentraciones variables.

El valor de la constante de velocidad de primer orden en la saturación es igual a 0,045  $seg^{-1}$  y fue calculada a partir del valor en el intercepto de la regraficación en doble recíproca, mientras que la constante aparente de disociación corresponde a  $4,07 \times 10^{-3}$  M.

En el gráfico competitivo que se muestra en la Fig. N° 2, se observa que la tiourea, compuesto que tiene la propiedad de captar radicales libres, inhibe la autooxidación del ascorbato, proceso que es lineal en las condiciones experimentales descritas, habiéndose calculado a partir del mencionado gráfico una constante de protección de  $1,75 \times 10^{-4}$  M.

La utilización del glicerol con el mismo propósito, permitió observar que la autooxidación del ascorbato en presencia de  $Cu^{2+}$  no sufre alteración alguna, tal como se muestra en la Figura N° 3.



**Fig. N° 2.-** Efecto de la tiourea sobre la autooxidación del ascorbato catalizada por el Cu<sup>2+</sup>. Medio de reacción: Tampón fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, ascorbato 0,033 mM y Cu<sup>2+</sup> 0,0066 mM y tiourea en diferentes concentraciones.

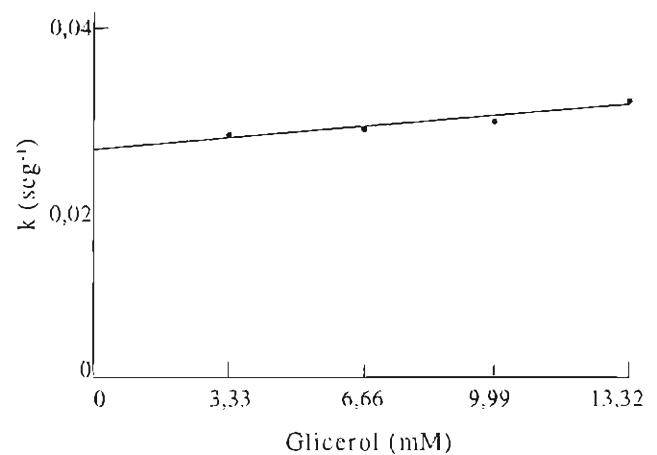
Cuando se utilizaron concentraciones de Cu<sup>2+</sup> 1,34 x 10<sup>-5</sup> M y ascorbato 3,3 x 10<sup>-5</sup> M, que son las que se usaron para el proceso de autooxidación, no fue posible escindir el puente disulfuro del ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB); en cambio, si se incrementa la concentración de ascorbato a 2,0 mM manteniéndose la de Cu<sup>2+</sup> a una concentración 0,01 mM, la liberación de tionitrobenzoato, que es el compuesto que se produce como consecuencia de la ruptura del puente disulfuro del DTNB, ocurre a una velocidad de 1,5 µM/min.

**Tabla N°2.-** Efecto de inhibidores sobre los procesos de autooxidación y ruptura de puentes disulfuro del DTNB.\*

Inhibidor (0,5 mmol)	Inhibición de la autooxidación (%)	Inhibición de la ruptura de puentes disulfuro (%)
Histidina	89,02	85,56
Citrato	50,00	53,00

\* Las condiciones de ensayo se describen en Métodos.

La presencia de histidina o citrato en el medio en que el ascorbato se autooxida por acción del Cu<sup>2+</sup>, ocasionó una notable inhibición, siendo mayor el efecto producido por la histidina. Un efecto similar se obtuvo cuando los compuestos anteriormente mencionados estuvieron presentes en una concentración 0,5 mM en el medio donde se produce la ruptura del puente disulfuro del DTNB por acción del sistema ascorbato/Cu<sup>2+</sup>.



**Fig. N° 3.-** Efecto del glicerol sobre la autooxidación del ascorbato catalizada por Cu<sup>2+</sup>. Medio de reacción: Tampón fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, ascorbato 0,033 mM y Cu<sup>2+</sup> 0,0066 mM y glicerol en concentraciones variables.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios sobre la cinética de oxidación del ascorbato catalizada por cobre, permitieron formular inicialmente un mecanismo que incluye una interacción entre el ion ascorbato y el ion cúprico, hecho que facilita la transferencia interna de un electrón. El ion cuproso formado es oxidado por el oxígeno molecular, y la forma de semiquinona del ascorbato, por el oxígeno y los iones cúpricos (26).

La autooxidación del ascorbato por metales de transición ha sido descrita por diversos autores (27, 28). Este proceso se realiza conjuntamente con la reducción del oxígeno molecular por un electrón y la formación de radicales libres hidroxilo (8). Los resultados mostrados en la Fig. N° 1 sugieren que en este proceso de autooxidación se formaría un complejo intermedio que limitaría dicha reacción, lo que está corroborado por la regraficación en doble recíproca.

También se ha mostrado que la oxidación del ascorbato se estimula ligeramente en presencia de  $Fe^{2+}$ , reacción que muestra un marcado incremento cuando se adiciona EDTA, y es inhibida en forma muy discreta por la superóxido dismutasa; estas observaciones permiten sugerir que el ascorbato es oxidado por el complejo EDTA/ $Fe^{2+}$ , lo que estaría acorde con un incremento del potencial rédox del ion férrico cuando forma complejo con el EDTA (29). Nuestros resultados son similares a las observaciones descritas anteriormente, conforme se aprecia en la Tabla N° 1, la presencia de  $Fe^{2+}$  o  $Co^{2+}$  ocasionó una discreta autooxidación del ascorbato, en comparación con aquella producida por el  $Cu^{2+}$ .

Siendo el pKa del ascorbato 4.25, significa que a pH fisiológico la forma predominante corresponde al anión ascorbato, compuesto que oxidativamente forma ácido dehidroascórbico, proceso que ocurriría mediante la oxidación reversible con la formación de un compuesto intermedio de radical ascorbilo (30). Las propiedades antioxidantes del ascorbato tienen relación con la baja reactividad que tiene el radical semidhidroascorbato (31, 37).

El efecto ejercido por la tiourea en el sentido de inhibir la autooxidación del ascorbato por el  $Cu^{2+}$ , probablemente haya sido ocasionado por la propiedad que tiene este compuesto para ligarse a metales (32), también existe la posibilidad de que la tiourea reaccione con el peróxido de hidrógeno que se forma en la secuencia de reacciones que se produce durante la autooxidación del ascorbato, aunque no debe descartarse la alta afinidad que tiene la tiourea por el ion cuproso, cuya oxidación permite la generación de radicales hidroxilo (33), resultado que es similar a la inhibición ejercida por este compuesto sobre la hidroxilación del salicilato por acción del ascorbato,  $Cu^{2+}$  y peróxido de hidrógeno. El gráfico de competición lineal mostrado por la tiourea, sugiere que este compuesto compite con el ascorbato en el pro-

ceso antes descrito, en cambio el glicerol no ejerció efecto alguno, pero sí fue capaz de inhibir considerablemente la ruptura del enlace disulfuro del DTNB (34).

La modificación selectiva de un residuo de histidina de la angiotensina I, se produce en condiciones en las cuales el ascorbato reacciona con cantidades catalíticas de  $Cu^{2+}$ . El daño oxidativo que dicho sistema ocasiona al péptido se realiza específicamente en la posición C-2 del anillo imidazólico del residuo de histidina del péptido. Nuestros resultados tienen cierta correlación con los anteriormente descritos, ya que la presencia de histidina en el medio de reacción de autooxidación produce una notable inhibición del proceso. Tanto el ascorbato como el  $Cu^{2+}$  y la histidina son compuestos que normalmente se encuentran en los alimentos y en las células del organismo (35).

No ha sido posible encontrar evidencias de la formación del radical superóxido durante el proceso de autooxidación del ascorbato, la acción inhibitoria mostrada por la superóxido dismutasa era probablemente debida al efecto de la molécula proteica de la enzima, y no a la remoción del radical superóxido (36).

Ciertos autores han indicado que la ruptura del puente disulfuro del DTNB por el sistema ascorbato/ $Cu^{2+}$  se realiza exclusivamente por acción de los radicales libres hidroxilo (8), ya que en presencia de catalasa o manitol se produce una notable inhibición. El hecho que la ruptura del puente disulfuro del ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico) no ocurra en las mismas condiciones experimentales en que se autooxida el ascorbato, permite sugerir que dicha escisión se produce no solamente por efecto de los radicales libres generados por el sistema ascorbato/ $Cu^{2+}$ , sino que debe operar otro mecanismo en forma paralela, tal como la reducción o la hidrólisis; lo que también estaría sustentado por el efecto inhibitorio que ejerce el glicerol sobre la ruptura del enlace disulfuro del DTNB, así como por el hecho de no afectar en forma alguna la autooxidación del ascorbato.

## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue financiado por el FEDU (Fondo Especial de Desarrollo Universitario), Proyectos N° 4240005 y 5240112.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Sauberlich H.** Conocimientos actuales sobre nutrición. 6ª Ed. Washington DC: OPS/OMS - ILSI; 1991. Publicación científica # 532:152-162.
- 2) **Marks J.** The vitamins. Their role in Medical practice. Lancaster, England: MTP Press Ltd. Falcon Home; 1985. pp. 185-93.
- 3) **Pauling L.** A re-evaluation of vitamin C. En: Hanck A, Ritzel G, editores. Re-evaluation of vitamin C. Nien, Suiza: Verlag Hans Huber Bern Stuttgart; 1977.
- 4) **England S y col.** The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann Rev Nutr* 1986; 6:365-406.
- 5) **Padh H.** Vitamin C: Newer Insights into its biochemical functions. *Nutr Rev* 1991; 49(3): 65-70.
- 6) **Jacob R.** Assessment of human vitamin C status. *J Nutr* 1990; 120:1480-5.
- 7) **Bates C.** Function and metabolism of vitamin C in man. En: "Vitamin C". Londres: Applied Science; 1981.
- 8) **Inoue H, Hirobe M.** Disulfide cleavage and insulin denaturation by active oxygen in the copper<sup>2+</sup>/Ascorbic acid system. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(3): 1075-9.
- 9) **Samuni A, Aronovitch J y col.** On the cytotoxicity of vitamin C and metals ions. *Eur J Biochem* 1983; 137:119-24.
- 10) **Shinar E, Navok T, Chevien M.** The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper. *J Biol Chem* 1983; 258:14778-83.
- 11) **Isbell H, Frush H.** Oxidation of L-Ascorbic; preparation of L-Thronic acid. *Carb Res* 1979; 72: 301-4.
- 12) **Robinson A, Reichheimer S.** Instability and functions: Ascorbic acid and glutaminy and asparaginy residues. *Am NY Acad Sci* 1975; 258: 314-6.
- 13) **Chion S.** DNA- and protein-scission activities of ascorbate. in the presence of copper ion or a copper-peptide complex. *J Biochem* 1983; 94: 1259-67.
- 14) **Aruoma O, Halliwell E, Gajewski E, Dizdaroglu M.** Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1991; 273: 2601-4.
- 15) **Frei B.** Ascorbic acid protects lipid in human plasma and LDL against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(Suppl): 1113S-1118S.
- 16) **Jialal L, Vega G, Grundy S.** Physiologic levels of ascorbat inhibit oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82:185-91.
- 17) **Witting I, Horwitt M.** Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J Nutr* 1964; 82: 19-33.
- 18) **Buettner G.** Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad Res Commun* 1986; 1: 349-53.
- 19) **Bendich A y col.** Interaction of dietary Vitamin C and Vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J Nutr* 1984; 114: 1588-93.
- 20) **Bendich A et al.** The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radical Biol Med* 1986; 2: 419-44.
- 21) **Aust S, Morehouse A, Thomas C.** Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol Med* 1985; 1: 3-25.
- 22) **Girotti A.** Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med* 1985; 1: 87-95.
- 23) **Klotz I, Campbell B.** Copper-induced hydrolysis of the disulfide bond. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96: 92-9.
- 24) **Lewin S.** Vitamin C: Its molecular biology and medical potential. Nueva York: Academic Press; 1976. pp. 6-9.
- 25) **Ellman G.** Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-8.
- 26) **Weissberger A y col.** Oxidation processes. XVI. The autoxidation of ascorbic acid. *J Am Chem Soc* 1943; 65: 1934-9.
- 27) **Khan M, Martell A.** Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J Am Chem Soc* 1967; 89(16): 4176-85.
- 28) **Khan M, Martell A.** Kinetics of metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid. III. Vanadyl ion catalyzed oxidation. *J Am Chem Soc* 1968; 90(22): 6011-7.
- 29) **Klein S, Cohen G, Cederbaum A.** Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochem* 1981; 20: 6006-12.
- 30) **Laroff G, Freesenden R, Schuler R.** The electron spin resonance spectra of radical intermediates in the oxidation of ascorbic acid and related substances. *J Am Chem Soc* 1972; 94(26): 9062-73.
- 31) **Cabelli D, Bielski B.** Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> radicals. A pulse radiolysis and stopped flow photolysis study. *J Phys Chem* 1983; 87: 1809-12.
- 32) **Cederbaum A et al.** Effect of thiourea on microsomal oxidation of alcohols and associated microsomal functions. *Biochem* 1979; 18: 1187-91.
- 33) **Butt V, Hallaway M.** The catalysis of ascorbate oxidation by iron copper and its complexes. *Arch Biochem Biophys* 1961; 92: 24-32.
- 34) **Troncoso L, Guija E, Haak H.** Ruptura de enlace disulfuro por el sistema Ascorbato-EDTA. *Bol Soc Quim Perú* 1994; 60(1): 78-85.
- 35) **Uchida K, Kawakishi S.** Site-specific oxidation of angiotensin I by copper<sup>2+</sup> and L-ascorbate: conversion of histidine residues to 2-imidazolones. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 20-6.
- 36) **Halliwell B, Foyer C.** Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem J* 1976; 155: 697-700
- 37) **Guija E y Troncoso L.** Vitamina C: algunos roles importantes. *Rev Acad Per Farm* 1995; 10 (1): 52-6.