

Acción Farmacológica, Biofísicoquímica y Estructura Dinámica de la Vitamina C

Juan R. de Xammar ORO* y M. Cristina DONNAMARÍA

*Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB),
CONICET-CIC-UNLP. CC 565, B1900BTE-La Plata, Argentina.*

RESUMEN. Conocida como ácido ascórbico, la Vitamina C es una vitamina que interviene en múltiples procesos, tales como: formación de hormonas, neurotransmisores, carnitina, conversión del colesterol en ácidos biliares, incremento en la absorción de hierro, además de su fundamental intervención en la síntesis del colágeno. Debido a que es un poderoso agente antioxidante, está asociada en la prevención de enfermedades degenerativas como las cataratas, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Es además esencial en la reacción del sistema inmunológico. A pesar de ser una molécula estructuralmente muy conocida es poco lo que se sabe de su dinámica y relación estructura-función. En este trabajo se realiza una minuciosa revisión que trata de aclarar los límites de los efectos beneficiosos y perjudiciales de dosis moderadas o altas de vitamina C y se presenta una síntesis de sus propiedades biofísicoquímicas y de la dinámica de su estructura en solución acuosa a la luz de resultados de simulación mediante dinámica molecular.

SUMMARY. "Pharmacological Action, Biophysical-Chemistry and Dynamical Structure of Vitamin C". Vitamin C, known as ascorbic acid, is a vitamin that participates in multiple processes, such as: hormones formation, neurotransmitters, carnitine, conversion of cholesterol into biliary acids, increase of the iron absorption, besides its fundamental intervention in the collagen synthesis. Since it is a powerful antioxidant it is associated in degenerative diseases prevention, such as cataracts, different cancer types and cardiovascular diseases. It plays an important role in the reaction of immune system. Although vitamin C is a structurally well known molecule, it is little knowledge about its dynamics and structure-function relationship. In this work it is done a thorough review that tries to clarify the limits of profitable effects and risks of moderate and high dose vitamin C. It is also shown a synthesis of its biophysics-chemical properties and the dynamics of its structure in aqueous solution using results of molecular dynamics simulation.

BREVE RESEÑA HISTORICA

El escorbuto, vocablo derivado de la palabra holandesa "scheurbook" que significa boca ulcerada, es una enfermedad que puede comenzar a manifestarse con alguno o varios de los siguientes síntomas: hinchazón y hemorragia en las encías (pudiendo incluir aflojamiento de las piezas dentales), moretones en el cuerpo, pobre cicatrización de heridas, piel reseca pruriginosa, inflamación de folículos pilosos (pudiendo llegar a una hiperqueratosis folicular), cansancio, dolores en las articulaciones, debilidad muscular, entre otros síntomas que si se descuidan pueden conducir a la muerte.

Esta enfermedad ya era conocida en época de las antiguas civilizaciones egipcia, griega y romana y, en el año 450 a.C., Hipócrates describía por

primera vez los síntomas de la misma. Fue buscando la forma de curarla que en 1747 Lind incluyó en la dieta diaria de un grupo de pacientes dos naranjas y un limón. Los pacientes mejoraron radicalmente y su experiencia se publicó en 1753¹. En 1907 Holst & Fröhlich² provocaron experimentalmente el escorbuto en el cobayo. Este animal presenta la enfermedad cuando recibe una dieta de avena y salvado sin complementos de verduras frescas. Pero la relación entre el escorbuto y algún tipo de sustancia presente en determinados vegetales, fue descubierta recién años más tarde por Harden & Zilva³ cuando en 1918 aislaron del jugo de limón, una sustancia que prevenía el escorbuto. En 1928 Szent-Györgyi⁴ aísla un compuesto cristalino en forma pura a partir del repollo y del tejido suprarrenal que

PALABRAS CLAVE: antioxidante, ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, ascorbato, escorbuto, vitamina C.

KEY WORDS: antioxidant, ascorbate, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, vitamin C, scurvy.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: *xammar@Argentina.com; xammar@iflysib.unlp.edu.ar

denominaron ácido hexurónico (posteriormente fue cambiado por ácido ascórbico).

En 1932 Svirbely & Szent-Györgyi ^{5,6}, y en forma independiente Waugh & King ⁷, reconocieron al ácido hexurónico como perteneciente al mundo de las vitaminas y la identificaron con el nombre de "Vitamina C". Hoy se identifica como vitaminas al conjunto de sustancias orgánicas presentes en alimentos naturales que son esenciales, en cantidades mínimas, para el metabolismo y la regeneración celular, cuya falta causa enfermedades carenciales. Cada vitamina realiza una función específica, en consecuencia la falta de una no puede ser reemplazada por otra.

En 1933 Birch *et al.* ⁸, con resultados contundentes, confirmaron a la vitamina C como el único y verdadero factor antiescorbuto. En ese mismo año Haworth & Hirst ⁹ lograron sintetizarla por primera vez. Posteriormente en varios laboratorios se estableció su estructura molecular, incluyendo el de Haworth, y se le asignó el nombre corriente de ácido ascórbico y de acuerdo a su nomenclatura, el nombre químico de 2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol. En 1936 se la comenzó a producir sintéticamente en gran escala para su venta al público.

Haworth & Szent-Györgyi recibieron en 1937, el premio Nóbel por sus investigaciones sobre la vitamina C. Hoy se reconoce como vitamina C a toda molécula que posea actividad antiescorbuto, químicamente lo son el ácido ascórbico y su forma oxidada el ácido dehidroascórbico.

ACCIÓN FARMACOLÓGICA

Las vitaminas actúan como coenzimas y como precursores de las coenzimas en la regulación de los procesos metabólicos y regeneración celular. Hoy se sabe que la vitamina C tiene un enorme abanico de funciones para mantener la salud. De hecho cada una de las células de los diferentes tejidos del organismo sufre cuando hay escasez de la misma. Se le atribuyen las siguientes acciones:

a) Esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico ¹⁰⁻¹³, por su participación en la actividad de los linfocitos, neutrófilos, fagocitos, anticuerpos y en la producción de interferón. Además actúa en las reacciones inflamatorias, ayudando a sintetizar inmunoglobulina para controlarlas. Probablemente una de las mayores controversias con respecto a la vitamina C, en décadas pasadas, era si realmente prevenía los cuadros catarrales. Hoy se sabe que, además de ser esencial para el sistema inmunológico, disminuye la formación de histamina, reduciendo así la severidad y duración de los síntomas alérgicos.

b) Favorece la absorción intestinal de hierro no hémico presente en los alimentos e inhibe la formación de nitrosaminas ¹⁴⁻¹⁶.

c) Como antioxidante la vitamina C trabaja conjuntamente con la vitamina E, coenzima Q y el betacaroteno (pro-vitamina A) protegiendo al organismo de los radicales libres ¹⁷⁻²⁰. Mientras que las últimas vitaminas actúan principalmente en las membranas celulares, la primera lo hace mayormente en los fluidos corporales. Cuando las tres están presentes su actividad antioxidante se complementa y es mayor que cuando lo hacen por separado. Al neutralizar los radicales libres se cree que contribuyen en disminuir el proceso de envejecimiento y degeneración de células. La forma oxidada, ácido dehidroascórbico, carece de poder antioxidante pero mantiene su propiedad antiescorbuto.

d) Participa en la metabolización de las grasas ²¹⁻²⁴, por lo que se la considera un factor importante para mantener los niveles adecuados de "lipoproteínas de baja densidad" (Low Density Lipoproteins, LDL) y de "lipoproteínas de alta densidad" (High Density Lipoproteins, HDL) conocidos vulgarmente como "colesterol malo" y "colesterol bueno".

e) Juega un papel fundamental actuando como coenzima en la síntesis del colágeno ²⁵⁻²⁹, una proteína que es el principal constituyente de los tendones y que también se encuentra presente en la piel, huesos, dientes, ligamentos, cartílagos y vasos sanguíneos. Por esta razón se considera que es importante en la prevención de la artritis y artrosis. Lo más probable es que el grueso de las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas del escorbuto se basen en el papel de la vitamina C en la síntesis del colágeno. En carencia de vitamina C el colágeno sintetizado es defectuoso y de mala calidad, por lo tanto todos los sistemas del organismo están comprometidos. Los vasos sanguíneos se inflaman, se tornan excesivamente permeables y se rompen fácilmente, esto puede contribuir a que se formen depósitos de colesterol en sus paredes. Asimismo queda comprometida la formación de hueso normal y el hueso que se forma carece de resistencia tensional y es defectuoso en su ordenación estructural. Los niños con escorbuto presentan desnutrición, apatía, irritabilidad, debilidad generalizada, mala cicatrización de heridas, petequias, equimosis y dolor óseo que a menudo determina una seudoparálisis. Si bien, los signos radiográficos esqueléticos del paciente con escorbuto (densidad ósea disminuida y corticales muy delgadas) pueden observarse en cualquiera de los huesos largos, son más destacados en las rodillas.

f) Es indispensable para el buen funcionamiento de las hormonas producidas por las glándulas suprarrenales ³⁰.

g) Participa en la hemostasia (mecanismo de coagulación) y en consecuencia en la cicatrización de heridas ³¹.

h) Es esencial en la biosíntesis de neurotransmisores en el sistema nervioso ^{32,33} y de carnitina en los músculos ³⁴.

A pesar de los numerosos trabajos en el tema aún no se sabe con certeza si el consumo suplementario puede ayudar a aumentar estas acciones o alguna de ellas, pero sí que su falta las perjudica.

Por último cabe señalar que las investigaciones realizadas por el dos veces Premio Nobel Linus Carl Puling conjuntamente con Cameron ³⁵⁻⁴⁵, y por otros investigadores ⁴⁶⁻⁶³ parecen indicar que una alimentación rica en esta vitamina ofrece una protección suplementaria contra varios tipos de cáncer, particularmente en cáncer de páncreas, estómago, pulmones, senos, boca, esófago y vejiga. Aunque una evidencia contundente sigue siendo aún hoy muy discutida, queda abierta esta posibilidad y al menos se recomienda mantener un consumo adecuado. Se sabe además que los tumores cerebrales en los niños recién nacidos y hasta los 6 años tienen relación con deficiencias de vitamina C en la madre durante su gestación y lactancia ⁶⁴⁻⁶⁷. Se supone que una concentración alta de nitrosaminas y sus precursores, nitritos y nitratos, es un factor de riesgo para los tumores del cerebro. Las vitaminas C y E inhiben la formación de nitrosaminas y así evitan la formación de estos tumores, particularmente en la temprana edad.

FUENTES ALIMENTICIAS Y DOSIS

Muchos animales tienen la capacidad de sintetizar la vitamina C, pero sin embargo el hombre, el mono, el cobayo y algunos otros pocos mamíferos no lo pueden hacer, sino que necesitan de fuentes naturales externas para adquirirla. Esto es debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactona-oxidasa, que participa en la vía del ácido urónico convirtiendo la L-gulonolactona en ácido L-ascórbico.

Las vitaminas del complejo B y la vitamina C son hidrosolubles y con excepción de la vitamina B₁₂, el organismo no puede almacenarlas, siendo necesaria su ingesta diaria para evitar su deficiencia. Las vitaminas hidrosolubles son absorbidas por el intestino y transportadas por el sistema circulatorio hasta los tejidos específicos donde serán usadas. Cuando la ingestión de vitaminas hidrosolubles excede los requerimientos

del organismo, una pequeña porción se almacena en los tejidos pero la mayor parte del exceso es eliminada a través de la orina. En el caso de la vitamina C al superarse los 3 g diarios, se comienza también a eliminar con las heces. La vida media de eliminación del ácido ascórbico absorbido por el organismo depende de la vía de administración, de la cantidad ingerida y de la velocidad de absorción. En términos generales se puede hablar de aproximadamente 14 a 20 días. Es por este motivo que los síntomas del escorbuto tardan de 4 a 8 semanas en aparecer en sujetos con una dieta deficiente en vitamina C.

La incorporación de vitamina C a nuestro organismo puede ser natural (de ingerir fundamentalmente vegetales) o sintética (por administración de suplementos farmacéuticos tales como los obtenidos a partir de glucosa en el laboratorio). La vitamina C incorporada por vía natural tiene la ventaja de ser absorbida con mayor disposición y permanecer en el organismo durante un periodo mayor ⁶⁸.

Los principales vegetales ricos en vitamina C son ⁶⁹: (se indica el contenido en % de la cantidad diaria recomendada por cada 100 g en estado crudo y fresco): grosellas (400%), brócoli (400%), perejil (313%), pimiento verde (200%), kiwi (196%), limón (160%), coliflor (120%), fresas (120%), coles de Bruselas (80%), naranja (76%), tomate (40%), nabo (34%), melón (30%). La mayoría de otras frutas y hortalizas crudas y frescas, al igual que el pescado y la leche, contienen vitamina C, aunque en menor cantidad. En consecuencia, una buena alimentación balanceada, que contenga principalmente vegetales verdes y cítricos (frescos), proveerá más que en forma suficiente la cantidad de vitamina C requerida por el organismo.

Los suplementos farmacéuticos de vitamina C son sumamente populares. Se disponen en forma de tabletas y cápsulas, al igual que en forma líquida. Al comprar suplementos es preferible elegir aquellos que contengan bioflavonoides (sustancias presentes en la capa blanca de los cítricos debajo de la cáscara) ya que mejoran la capacidad de absorción y utilización. Como la vitamina C no incorporada al organismo se elimina rápidamente (unas cuatro h después de ser ingerida) es conveniente administrar los suplementos en dos o tres dosis a través del día ⁶⁹. Varios estudios ⁷⁰⁻⁷⁵ indican que los suplementos de vitamina C esterificada (conocidos como éster C) son especialmente efectivos, ya que en esta forma la vitamina se absorbe más rápidamente, permanece en los tejidos mayor tiempo, y se elimina en menor cantidad a través de la

orina. Además al no ser una forma ácida las altas dosis no causan trastornos gástricos.

Los organismos de salud internacionales como The Food and Nutrition Board (FNB) y The Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos ⁶⁹ recomiendan, para personas sanas, una ingesta diaria de vitamina C de 60 mg para adultos y de 30 a 45 mg para niños menores de 14 años (no lactantes). Muchos investigadores sostienen que estas dosis son demasiado bajas para mantener una salud óptima y que meramente representan el mínimo requerido para evitar los más obvios síntomas de deficiencia, no para fomentar una salud óptima. Las necesidades aumentan en caso de embarazo, lactancia, hipertiroidismo, síndrome de mala absorción, deportistas con alto grado de entrenamiento (ya que en ellos aumenta considerablemente la producción de radicales libres), ser fumador o tomar anticonceptivos orales, y con el uso de ciertos medicamentos como estrógenos, barbitúricos y salicilatos. En los enfermos la dosis adecuada de vitamina C puede ser diferente para cada paciente. Ésta depende de la patología que se desea tratar.

Actualmente la FNB está estudiando recomendar pasar de 60 mg diarios (como cantidad dietética diaria recomendada para una persona sana) a 100 o 120 mg y sugerir 1000 mg diarios como nivel superior tolerable de ingesta, es decir, el mayor nivel diario que brinde seguridad sin producir riesgo o efecto adverso para la salud. [Véase más adelante "Efectos de Altas Dosis"].

Cuando se mide el contenido sérico de ácido ascórbico de una persona normal resulta de 0,6 a 2 mg/dl. El escorbuto se instala cuando ese valor es menor a 0,2 mg/dl. En este caso se recomienda ingerir 100 mg de vitamina C, cada 8 h durante la primera semana y luego bajar a 100 mg diarios durante las semanas siguientes. Otro régimen posológico consiste en administrar 1 a 2 g al día durante 2 ó 3 días, seguido de 500 mg al día durante una o dos semanas ⁶⁹.

Debe tenerse en cuenta que el alcohol y algunos medicamentos (ingeridos en forma continuada o en exceso) como por ejemplo, anticoagulantes, antidepresivos, anticonceptivos y aspirina pueden reducir los niveles de vitamina C en el organismo.

El embarazo aumenta la necesidad de la mayoría de los nutrientes, incluida la vitamina C. La placenta y el cordón umbilical transmiten esta vitamina de la madre al bebé y al momento del nacimiento los niveles del bebé duplican los de la madre. Por esta razón las mujeres embarazadas requieren vitamina C adicional. Esta necesi-

dad se mantiene durante la lactancia, ya que la leche materna es una fuente de esta vitamina. Pero el exceso tampoco es saludable. Cuando la dosis excede los 2 g diarios puede provocar diarreas en el recién nacido. También existe la posibilidad del "escorbuto de rebote" (*cf.* "Efecto de altas dosis").

Al ser una vitamina que se destruye fácilmente por oxidación, y más aún en presencia de hierro, cobre, álcalis y calor, es muy fácil que sea realmente menor la cantidad suministrada por los alimentos con respecto a su contenido original. Si éstos se cocinan en un medio acuoso, la pérdida de la vitamina es mayor, ya que ella es hidrosoluble. La misma vitamina C expuesta al aire sufre una merma. Así sucede cuando los jugos de fruta o verdura no son consumidos inmediatamente. Por ejemplo, el jugo de naranja pierde la mitad de su contenido de vitamina C a la media hora de haber sido extraído de la fruta.

Se debe tener en cuenta que el contenido de vitamina C en los alimentos disminuye notablemente cuando: son cocinados, almacenados por largo tiempo y preparados en forma de conserva. Por estas razones puede que uno se engañe y que la dieta no este cubriendo las necesidades de vitamina C del organismo.

Es importante hacer notar que la gran mayoría de los profesionales de la salud coinciden en que la mejor forma de obtener los aportes recomendados de esta vitamina es ingiriendo una dieta balanceada que contenga variedad de alimentos frescos, preferentemente vegetales como frutas (principalmente cítricos) y verduras.

En la industria alimenticia el ácido ascórbico y sus derivados se utilizan como antioxidantes en productos cárnicos, conservas vegetales, bebidas refrescantes, zumos, productos de repostería y en la fabricación de cerveza. El ácido ascórbico contribuye a evitar el oscurecimiento de la fruta cortada en trozos y a evitar la corrosión de los envases metálicos. También se utiliza el ácido ascórbico en panadería, no como antioxidante sino como auxiliar tecnológico, para mejorar el comportamiento de la masa. Su adición a mostos y vinos permite reducir el uso de sulfitos. Su utilidad como vitamina es muy escasa en estos casos, ya que en gran parte se destruye al cumplir su papel de antioxidante. Es por esto que la adición de ácido ascórbico como antioxidante no permite hacer un uso publicitario del potencial enriquecimiento en vitamina C del alimento. En algunos países, entre ellos Estados Unidos, se utilizan como aditivos alimentarios sustancias semejantes al ácido ascórbico (ácido

eritórico), que carecen de actividad vitamínica. En la Unión Europea su utilización fue autorizada recientemente.

EFECTOS DE ALTAS DOSIS

Existen infinidad de productos comerciales que aportan 1 g o más de vitamina C por comprimido y hay quienes recomiendan la ingestión de hasta cinco o más comprimidos, caso de los que creen que su administración actúa como anticancerígeno. Normalmente no se presenta toxicidad debido a que, como ya se ha señalado, la vitamina C es hidrosoluble y el cuerpo excreta regularmente todo exceso por vía urinaria. Sin embargo, existen estudios 76-90 que han mostrado que las dosis excesivas de vitamina C pueden llevar a la aparición de algunas dificultades para la salud que deben tenerse en cuenta. Las informadas con mayor frecuencia son: a) anemia hemolítica en pacientes con déficit de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6-PD); b) exceso de acidificación urinaria, esto puede facilitar la precipitación de cristales de sulfonamidas y/o sus metabolitos y además, puede alterar la acción de otros medicamentos, aumentando la reabsorción tubular renal de drogas ácidas y disminuyendo la de drogas alcalinas; c) disminución de la síntesis de cobalamina (vitamina B₁₂); d) favorecimiento de litiasis renal (formación de cálculos renales por la excesiva precipitación de cristales de oxalatos en el tracto urinario en pacientes hiperoxalúricos) y de acceso de gota; e) disminución de la excreción renal de los salicilatos, aumentando así la salicilemia, por tanto debe evitarse la administración conjunta de altas dosis de éstos preparados; f) aceleración de la excreción renal de mexiletina y acrecentamiento de la toxicidad tisular de la deferoxamina; g) provocación de hiperuricosuria (eliminación de ácido úrico por orina superior a 800 mg/24 h); h) interferencia en la absorción de los anticoagulantes orales; i) posibilidad de incrementar la absorción de hierro, por lo tanto se debe tener precaución en los casos de hemocromatosis, anemia sideroblástica o talasemia (la administración concomitante con deferoxamina, si bien es utilizada en casos de intoxicación con hierro para aumentar su excreción, puede aumentar la toxicidad tisular del hierro, por lo que se debe tomar medidas preventivas especialmente en personas ancianas con problemas cardíacos); j) interferencias con los métodos de laboratorio: se han descrito alteraciones de los resultados de laboratorio en la determinación de glucosuria (falso positivo en la prueba de glucosa urinaria cuando se utiliza

como reactivo el sulfato cúprico y por el contrario falso negativo al utilizar el método de glucosa oxidasa) y de sangre oculta en heces (falso negativo en las prueba de sangre oculta en heces 48-72 h después de la ingestión de ácido ascórbico); k) algunas personas desarrollan diarrea con sólo unos cuantos gramos de vitamina C al día, mientras que otras pueden tomar 10 veces esta cantidad sin problemas.

Se debe tener en cuenta que la interrupción repentina después de la ingesta prolongada de grandes cantidades de vitamina C puede, en algunos casos, conducir al efecto que se intenta evitar, debido a un proceso conocido como "escorbuto de rebote". Básicamente se piensa que esto sucede porque el organismo se satura, disminuye la absorción de vitamina C (para adaptarse a esos niveles sumamente altos) y cuando se retorna a una ingesta normal, el organismo prosigue con esa absorción disminuida, llevando al individuo a un estado de deficiencia. Existen estudios que se contradicen al respecto ⁹¹⁻⁹⁷, ya que algunos directamente cuestionan la existencia de este efecto y otros afirman que si bien los casos son reducidos debe tenerse en cuenta su aparición especialmente en los recién nacidos provenientes de madres que durante la gestación exageraron el consumo de vitamina C (la que transmitieron a su hijo) y que al nacer dejaron de recibir el mismo caudal vitamínico. Mientras la existencia del escorbuto de rebote sea polémica es bueno favorecer el lado de cautela y aconsejar la reducción gradual de dosis altas del suplemento.

Por otra parte es útil considerar que la vitamina C favorece la absorción de aluminio y que este elemento puede ser tóxico. Por esta razón no se debe ingerir grandes cantidades de vitamina C conjuntamente con medicamentos que contienen aluminio, como por ejemplo algunos antiácidos y antihidrólicos. Además la vitamina C es un potente agente reductor que interfiere en los tests basados en reacciones de óxido-reducción, pudiendo dar resultados falsos negativos en las pruebas de sangre oculta en materia fecal. Asimismo, los valores de concentraciones urinarias de glucosa determinados por el método de glucosa-oxidasa pueden estar falsamente disminuidos, lo mismo sucede con las concentraciones de bilirrubina, en tanto que las concentraciones urinarias de ácido úrico y oxalato pueden estar falsamente aumentadas.

Otro factor a tener en cuenta es que si bien el ácido ascórbico es reconocido como un muy buen antioxidante (particularmente en la neutralización de peróxidos y radicales libres de otros

oxígenos), a muy altas dosis puede cambiar radicalmente este comportamiento y volverse un oxidante, según lo han reportado trabajos como los de Levine *et al.*⁷⁷ y Negrete-Salvayre *et al.*⁷⁸. En este último artículo también se demostró que la presencia simultánea de vitamina E resultó eficaz al impedir que esas dosis altas de vitamina C devinieran en pro-oxidantes.

Por último, como con toda droga, debe tenerse en cuenta la posible hipersensibilidad de cada individuo al ácido ascórbico.

BIOFISICOQUÍMICA Y ESTRUCTURA DINÁMICA DE LA MOLÉCULA

La fórmula empírica del ácido L-ascórbico es C₆H₈O₆ con peso molecular 176,12 y su fórmula estructural se muestra en la Figura 1.

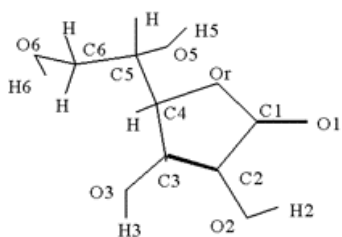


Figura 1. Estructura molecular del ácido L-ascórbico (C: átomos de carbono, O: átomos de oxígeno, Or: átomo de oxígeno del anillo, H: átomo de hidrógeno).

Químicamente el ácido ascórbico (2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol) es una lactona de seis carbonos del ácido 2-ceto-L-glucónico, que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas. Posee una agrupación endiol (dos grupos hidroxilo en los extremos de un doble enlace entre C2 y C3) y actúa, al igual que todos los endioles, como reductor energético. Como posee dos carbonos asimétricos (C4 y C5) son posibles dos pares de isómeros ópticamente activos. La acción contra el escorbuto reside casi por completo en el isómero L (ácido L-ascórbico). Las formas D (ácido D-isoascórbico y ácido D-araboascórbico) son prácticamente inactivas contra el escorbuto, pero muestran un potencial óxido-reducción similar al del isómero L. Es fácilmente soluble en agua (33g en 100 ml) y algo soluble en alcohol etílico (3 g en 100 ml), ambos a 20 °C. Es un ácido comparativamente fuerte (más fuerte que el acético ya que en soluciones acuosas tiene un pH de 3). Al ceder hidrógeno se oxida de modo reversible en

el organismo hacia ácido L-dehidroascórbico, pero si llega a pasar a ácido 2,3 dicetogulónico pierde irreversiblemente su propiedad antiescorbuto (Figura 2).

Comercialmente la vitamina C es frecuentemente una mezcla de ácido ascórbico, ascorbato de sodio y/o otros ascorbatos. Los productos con gran contenido de ascorbatos son mucho menos ácidos que los de ácido ascórbico puro, motivo por el cual son recomendados a personas con problemas de irritaciones gastrointestinales.

Como ya se ha señalado, la vitamina C se absorbe fácilmente en el intestino delgado, más precisamente en el duodeno (las dietas ricas en zinc o pectinas pueden disminuir esta absorción), y pasa a la sangre por medio de un proceso de transporte activo de los iones de sodio. Este proceso es saturable y dependiente de la dosis, ya que al ingerir grandes cantidades de la vitamina, el porcentaje que se absorbe es mucho menor. Tal vez, en altas concentraciones, exista un pequeño porcentaje que pase por difusión simple^{98,99}.

Las funciones fisiológicas de la vitamina C son fuertemente dependientes de su capacidad como agente óxido-reductor. Esta vitamina funciona como un cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores^{28,77,82}. De este modo facilita: a) la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en el procolágeno, en hidroxiprolina e hidroxilisina en el transcurso de la síntesis de colágeno; b) la oxidación de cadenas laterales de lisina en proteínas para proporcionar hidroxitrimetilisina para la síntesis de carnitina; y c) la conversión de ácido fólico en ácido folínico. Es esencial para la oxidación de ciertos aminoácidos (fenilalanina y tirosina) en el metabolismo del triptofano y en la síntesis de noradrenalina.

El ácido ascórbico favorece la actividad de una enzima amidante que se cree participa en el procesamiento de algunas hormonas peptídica, como la oxitocina, la hormona antidiurética y la colecistocinina^{28,30,77,82}. Al reducir, en el estómago, el hierro férrico no heme al estado ferroso,

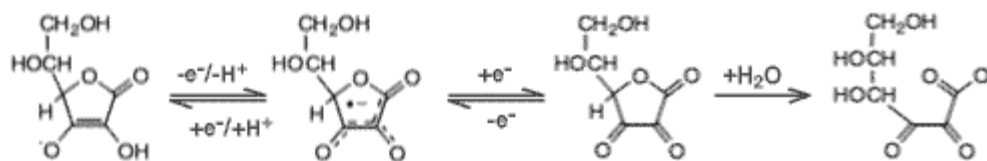


Figura 2. ascorbato, radical ascorbil, ácido dehidroascórbico y 2,3-dicetogulónico.

el ácido ascórbico también favorece la absorción intestinal de hierro. Además, dicho ácido participa en la esteroidogénesis suprarrenal.

En relación con su actividad antioxidante, el ácido ascórbico es un excelente captador de radicales libres que neutraliza especies como el H_2O_2 , el O_2^- y el ácido hipocloroso. En el curso de estas reacciones, se transforma en ácido dehidroascórbico, el que puede ser reciclado nuevamente a ascórbico por diversos mecanismos, entre ellos por la acción del glutatión (GSH) que es, de por sí, un antioxidante fundamentalmente involucrado en la destrucción de hidroperóxidos. El GSH por medio de intervención enzimática (dehidroascorbato-reductasa, tiol-transferasa o proteína-ditiol-isomerasa) revierte el dehidroascórbico a ascorbato o ácido ascórbico.

Se han identificado como vías de metabolismo de la vitamina C, en seres humanos, su conversión en oxalato y también en ácido ascórbico-2-sulfato y la posterior excreción, de ambas, en la orina.

Mediante simulación por dinámica molecular Donnamaría, Caffarena y de Xammar Oro 100 investigaron la relación estructura-función (hidratación y estructura dinámica) en el L-ácido ascórbico (AA) y en su forma oxidada el L-ácido dehidroascórbico (DA), cuando están en solución acuosa (agua SPC/E), siendo este el primer trabajo en su tipo. Estos aspectos están intrínsecamente correlacionados con la actividad bioquímica de la molécula. La estadística de formación de enlaces de hidrógeno (dinámicos) entre la vitamina C y el agua, y el coeficiente de difusión agua-agua obtenidos, indicaron que la presencia de vitamina C perturba fuertemente el patrón de estructura tetraédrica del agua y su movilidad produciendo un decrecimiento simultáneo del coeficiente de difusión (agua-agua) y del número de moléculas de agua ligadas, siendo la forma oxidada la que presenta cambios más destacados. Estos parámetros denotarían un cierto grado de hidrofobicidad de la molécula, debiéndose la solubilidad de la misma a factores estéricos, ya que ambas formas (AA y DA) caben perfectamente dentro de la red tetraédrica del agua (ver distancias y detalles en cita [100]). Como era de esperarse los grupos laterales se manifestaron hidrofílicos, y observamos en ellos un alto grado de movilidad rotacional lo que les daría la propiedad de alterar la estructura del agua (cambios en los enlaces de hidrógeno). Estas propiedades estérica y dinámica de la vitamina C son consistentes con su solubilidad en medios

acuosos. La hidrofobicidad manifestada por su anillo le permitiría lograr una cierta penetración en las membranas. De esta manera la vitamina C lograría cumplir sus funciones biológicas en los medios fisiológicos acuosos y lipídicos, aunque en este último en menor grado. Asimismo se ha observado que el plegamiento parcial entre el anillo y los grupos laterales produce un arreglo espacial de los grupos hidroxilos que maximizan la interacción enlace de hidrógeno con la estructura tetraédrica del agua, logrando una mayor compatibilidad entre agua y vitamina C.

También, para el conocimiento total de la estructura dinámica de la vitamina C, se debe considerar la posible formación estadística de enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que da lugar a varias posibles conformaciones de la molécula con diferentes grados de estabilidad, que a su vez influye sobre la interacción de la vitamina C con el agua circundante. Esto puede volverse un factor importante para su acción biológica.

En particular los autores realizaron un análisis conformacional completo ab-initio de la molécula aislada y en forma cristalina, utilizando el paquete Gaussian 94 (HF-SCF a nivel de Funcional de la Densidad). La estabilidad relativa se obtuvo mediante optimizaciones de energía incluyendo efectos de correlación con el método híbrido de Funcionales de la Densidad B3-LYP (Becke three parameters gradient correlation) con bases doblemente polarizadas 6-31+G(2d, 2p). La notación estándar utilizadas para estas correcciones es: B3-LYP/6-311+G(2d, 2p)/HF/6-31G(d,p) (ver Tabla 9 en cita ¹⁰¹). Milanésio *et al.* ¹⁰¹ encontraron seis posibles conformeros estables, según las preferencias energéticas, caracterizados por la existencia de enlaces de H intramoleculares (internos). Las características de cada conformero así como sus estabilidades relativas respecto del más estable según Milanésio, el conformero (g), se muestra en la Figura 3.

Según este análisis los conformeros más probables serían los d, e, y f. Cuando la molécula esta aislada la formación de enlaces de H internos puede considerarse un factor estabilizante. Todos los conformeros presentan al menos dos enlaces de H, pero los que tienen mayor peso para estabilizar son los que involucran al grupo O3-H, actuando como dador de protones. En el cristal el grupo O3-H es el único que no se comporta como aceptor de protones, desde sus átomos vecinos. En realidad ese grupo es el grupo ácido de la vitamina C, entonces no es sorprendente que actúe como un potente dador

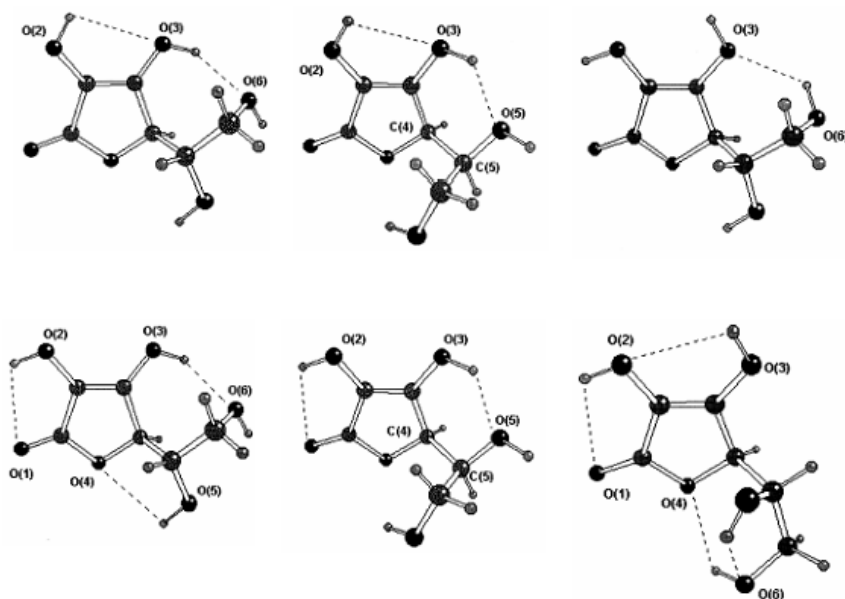


Figura 3.
Aspecto geométrico de 6 posibles conforméres de la ácido ascórbico debido a enlaces de hidrógeno intra-moleculares.

de protones y que al mismo tiempo sea un muy pobre aceptor de protones. Este es un ejemplo acerca de como están interrelacionados los aspectos estructura-función de una molécula.

Sin embargo, los datos de NMR reportados por Reyd ¹⁰² para la vitamina C en agua difieren de los citados por Milanesio, en el sentido que las más probables son las conformaciones d y f, que son las que involucran el ya citado grupo O3-H, ya que la forma de empaquetamiento de esas conformaciones hace más efectiva la formación de enlaces de H con las moléculas de agua del solvente.

Es indudable que los resultados obtenidos en estructura cristalina y en moléculas aisladas no son los biológicamente relevantes, pero sirven como pauta. Respecto de las energías puestas en juego, puede esperarse que la formación de enlaces de H intermoleculares en presencia de moléculas de agua altere la estabilidad relativa observada en los conforméres cristalinos. Asimismo la gran mayoría de drogas farmacéuticas son moléculas conformacionalmente móviles (estructura dinámica) y su acción biológica estará determinada por su conformación en solución acuosa.

La estadística de formación de enlaces de H dinámicos entre la vitamina C y el agua y el coeficiente de difusión agua-agua obtenido por los autores ¹⁰⁰, indicando que la presencia de vitamina C perturba fuertemente el patrón de estructura tetraédrica del agua y su movilidad, apoyan los datos de NMR de Reyd, en el sentido que la forma de empaquetamiento de las formas oxidada y reducida de la vitamina C, hace

más efectiva la formación de enlaces de H con las moléculas del solvente.

CONCLUSIÓN

A pesar de su ya larga historia, es evidente que son necesarias futuras investigaciones que nos permitan ir mucho más allá de la prevención de la deficiencia de vitamina C y poder así determinar con mayor precisión las funciones bioquímicas y farmacológicas, particularmente como cofactor de las enzimas y su relación con el sistema inmune, como así también para confirmar y aclarar los límites de los efectos beneficiosos y perjudiciales de las dosis moderadas o altas de vitamina C. Hasta tanto, no hay motivo de alarma para aquellas personas que toman suplementos vitamínicos de ácido ascórbico que no superan los 500 mg por día. La cantidad óptima de 100-200 mg diarios puede obtenerse fácil y agradablemente sin tener que acudir a suplemento alguno. Basta con una ingesta diaria de frutas cítricas y/o hortalizas o vegetales verdes. Lo mejor de esta alternativa, respecto a los suplementos, es que las frutas, hortalizas y vegetales verdes también contienen muchos otras vitaminas, minerales y otros componentes necesarios para una buena salud. Si debe tenerse en cuenta que hay ciertas patologías y conductas de vida que consumen fuertemente esta vitamina y en estos casos sí es adecuado la ingesta suplementaria para no caer en niveles de carencia.

A pesar de que en muchos países existen numerosos productos farmacéuticos de venta libre, anunciados como "suplementos dietarios" o denominaciones similares, la administración de

vitaminas debe ser realizada siempre bajo control médico pues sus efectos, beneficiosos para ciertas dolencias, pueden tener efectos secundarios o consecuencias importantes frente a la presencia de otras enfermedades en la persona receptora.

Los estudios clínicos también continúan precisando el papel de la vitamina C en la prevención y tratamiento de cataratas, ciertos cánceres y otras enfermedades humanas. Pero el aspecto que más resta determinar es el básico, su relación estructura-función.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y de los Departamentos de Ciencias Biológicas y de Química de la FCE-UNLP. J.R. de X.O. es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET y Profesor de la FCE-UNLP. M.C.D. es miembro de la Carrera del Investigador de la CIC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lind, J. (1753) *"A treatise of scurvy"*. Printed by Sands, Murray and Cochran for A. Kincaid and A. Donaldson. Edinburgh.
- Holst, A. & T. Fröhlich (1907) *J. Hyg.-Camb.* 7: 634-71.
- Harden, A. & S.S. Zilva (1918) *Biochem. J.* 12: 259-69.
- Szent-Györgyi, A. (1928) *Biochem. J.* 22: 1387-409.
- Svirbely, J.V. & A. Szent-Györgyi (1932) *Nature* 129: 690-1.
- Svirbely, J.V. & A. Szent-Györgyi (1932) *Biochem. J.* 26: 865-70.
- Waugh, W.A. & C.G. King (1932) *J. Biol. Chem.* 97: 325-31.
- Birch, T.W., L.J. Harris & S.N. Ray (1933) *Nature* 131: 273-4.
- Haworth, W.N. & E.L. Hirst (1933) *J. Soc. Chem. Ind. (London)* 52: 645-7.
- Thomas, W.R. & P.G. Holt (1978) *Clin. Exp. Immunol.* 32: 370-9.
- Campbell, J.D., M. Cole, B. Bunditruvorn & A.T. Vell (1999) *Cell Immunol.* 194: 1-5.
- Douglas, R.M., E.B. Chalker & B. Treacy (2000) *"Vitamin C for preventing and treating the common cold"*. Cochrane Database Syst. Rev. (2)CD000980.
- Songlin, L., B.T. Kenneth, J.K. Stephen & M.J. Jedrejas (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 15125-30.
- Lynch, S.R. & J.D. Cook (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 355: 32-44.
- Bendich, A. & M. Cohen (1990) *Toxicol Lett.* 51: 189-90.
- Lynch S.R. & R.J. Stoltzfus (2001) *"Iron and Ascorbic Acid: Proposed Fortification Levels and Recommended Iron Compounds"*. Conference presented as part of the technical report on "Nutrient Composition for Fortified Complementary Foods". Published by "Pan American Health Organization", Washington, D.C., October 4-5.
- Halliwell, H. & J.M.C. Gutteridge (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 1-8.
- Helmut, S. & S. Wilhelm (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1315S-21S.
- Blumberg, J.B. (1995) *Am. J. Clinical Biochem.* 62(6) (Suppl): 1521-6.
- Padayatty, S.J., A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta & M. Levine (2003) *J. Am. Coll. Nutr.* 22(1): 18-35.
- Ginter, E. & P. Bobek (1981) *"The influence of vitamin C on lipid metabolism"*. Ed. J.N. Counsell and D.H. Hornig, London.
- Kaneko, T., K. Kaji & M. Mastuo (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 176-80.
- Martin, A. & B. Frei (1997) *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1583-90.
- Vinson, J. & J. Jang (2001) *J. Med. Food* 4: 187-92.
- Barnes, M.J. & E. Kodicek (1972) *Vitam. Horm.* 30: 1-43.
- Murad, S., D. Grove, K.A. Lindberg, G. Reynolds, A. Sivarajah & S.R. Pinnel (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2879-82.
- Murad, S., S. Tajima, G.R. Johnson, A. Sivarajah & S.R. Pinnel (1983) *J. of Invest. Dermatol.* 81: 158-612.
- Levine, M (1986) *New Engl. J. Med.* 31: 892-902.
- Peterkofsky, B. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1113S-27S.
- Levine, M. & K. Morita (1985) *Vitam. Horm.* 42: 1-64.
- Sayed, S.M., P.B. Roy & P.T. Acharya (1975) *J. Indian Med. Assoc.* 64: 120-3.
- Kratzing, C.C., J.D. Kelly & B.A. Oelrichs (1982) *J. Neurochem.* 39: 625-7.
- Schreiber, M. & S. Trojan (1991) *Physiol. Res.* 40: 413-8.
- Hulse, J.D., S.R. Ellis & L.M. Henderson (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 1654-9.
- Cameron, E. & L. Pauling (1973) *Oncology* 27: 181-92.
- Cameron, E. & L. Pauling (1974) *Chem. Biol. Interact.* 9: 273-83.
- Cameron, E. & L. Pauling (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3685-9.
- Pauling, L. (1977) *Linus Pauling Inst. Sci. Med. Newslett.* 1: 1-2.
- Cameron, E. & L. Pauling (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4538-42.
- Cameron, E. & L. Pauling (1978) *J. Intern. Acad. Prev. Med.* 5: 8-29.
- Cameron, E. & L. Pauling In (1979) *"Cancer and Vitamin C"*. Ed. W.W. Norton & Company, Inc, New York.
- Pauling, L. (1980) *New Engl. J. Med.* 302: 694-4.
- Cameron, E. (1982) *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.* 23: 115-27.
- Pauling, L., J.C. Nixon, F. Stitt, R. Marcuson, W.B. Dunham, R. Barth, K. Bensch, Z.S. Herman, B.E. Blaisdell, C. Tsao, M. Prender, V. Andrews, R. Willoughby & E. Zuckerkandl (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 5185-9.
- Cameron, E. & L. Pauling (1993) *"Cancer and Vitamin C"*. Ed. Camino Books Inc., Philadelphia, PA.
- Liotti, F.S., M. Bodo & V. Talesa (1983) *Int. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 106: 69-70.
- Liotti, F.S., A. Menghini, P. Guerrieri, V. Talesa & M. Bodo (1984) *Int. J. Cancer Res. and Clin. Oncol.* 108: 230-2.
- Block, G. (1991) *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 270S-82S.
- Eckert-Maksic, M., I. Kovacek, Z.B. Maksic, M. Osmak & K. Paveli (1991) "Effect of ascorbic acid and its derivatives on different tumors in vivo and in vitro". In: *Molecules in Natural Science and Medicine. An Encium for Linus Pauling*. Edited by Maksic Z.B., Eckert-Maksic & M. Ellis Horwood, New York. 509-24.
- Mashiba, H. & K. Matsunaga (1992) *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 33: A2649.

51. Naidu, A.K., M. Wiranowska, S.H. Kori, L.D. Procop & A.P. Kulkarni (1993) *Anticancer Res.* **13**: 1469-71.
52. Sauberlich, H.E. (1994) "Vitamin C and Cancer". In: *Nutrition and disease update cancer*. Ed. by K.K. Carroll & D. Kritchevsky. AOCS Press, Champaign, Illinois. 111-57.
53. Lupulescu, A. (1994) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **64**: 3-14.
54. Ghosh, J. & S. Das (1995) *Jpn. J. Cancer Res.* **76**: 1174-8.
55. Uddin, S. & S. Ahmad (1995) *Comprehen. Therap.* **21**: 41-5.
56. Drake, I.M., M.J. Davies, N.P. Mapstone, M.F. Dixon, C.J. Schorah, K.L. White, D.M. Chambers & A.T. Axon (1996) *Carcinogenesis* **17**: 559-62.
57. Roomi, M.W., D. House, M. Eckert_Maksic, Z.B. Maksic & C.S. Tsao (1998) *Cancer Lett.* **122**: 93-9.
58. Roomi, M.W., D. House & C.S. Tsao (1998) *Cancer Biochem. Biophys.* **16**: 295-300.
59. Agus, D.B., J.C. Vera & D.W. Golde (1999) *Cancer Res.* **59**: 4555-8.
60. Makino, Y., H. Sakagami & M. Takeda (1999) *Anti-cancer Res.* **19**: 3125-32.
61. Liu, J.W., N. Nago, K. Kageyama & N. Miwa (2000) *Anticancer Res.* **20**: 113-8.
62. Naidu, A.K., R.C. Karl, K.A. Naidu & D. Coppola (2003) *Digest Dis. Sci.* **48**: 230-7.
63. Verrax, J., J. Cadrobbi, M. Delvaux, J.M. Jamison, J. Gilloteaux, J.L. Summers, H.S. Taper & P.B. Calderon (2003) *Eur. J. Med. Chem.* **38**: 451-7
64. Bunin, G.R., R.R. Kuijten, J.D. Buckley, L.B. Rorke & A.T. Meadows (1993) *New Engl. J. Med.* **329**: 536-41.
65. Foreman, N. K., A.D. Pearson, G.R. Bunin, P.A. Witman & A.T. Meadows (1993) *New Engl. J. Med.* **329**: 1963-3
66. Preston-Martin, S., J.M. Pogoda, B.A. Mueller, F. Lubin, B. Modan, E.A. Holly, G. Filippini, S. Cordier, R. Peris-Bonet, W. Choi, J. Little & A. Arslan (1998) *Childs Nerv. Syst.* **14**(10): 551-7.
67. Howe, G.R., J.D. Burch, A.M. Chiarelli, H.A. Risch & B.C.K. Choi (1998) *Cancer Res.* **49**: 4349-52.
68. Thiel, R. (2003) "The truth about vitamins in supplements". Published by American Naturopathic Medical Association Monitor (ANMAM), USA.
69. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids (2000) Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Ed: National Academy Press. Washington DC.
70. Verlangieri, A.J. (1988) "Acute Study to Determine the Relative Rate of Absorption and Excretion of Ester C[®] Calcium Ascorbate, U.S.P. Calcium Ascorbate with an Added Metabolite and Another Commercial Ascorbate". Published by University of Mississippi, USA.
71. Bland, J. (1989) "The Key to the Power of Vitamin C and Its Metabolites". Keats Publishing, New Canaan, CT.
72. Bush, M.J. & A.J. Verlangieri (1987) *J. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **57**:137-40.
73. Verlangieri, A.J., M.J. Fay & A.W. Bannon (1991) *Life Sci.* **48**: 2275-81.
74. Wright, J.V. (1987) "A Human Clinical Study of Ester C[®] vs. L-Ascorbic Acid". Published by Meridian Valley Clinical Lab. Kent, Washington.
75. Perricone, N.V. (1997) *J. Geriatr. Dermatol.* **5**: 1622-70.
76. McMurray, W.C. (1982) "A Synopsis of Human Biochemistry: With Medical Applications". Publishers by Harper & Row, Philadelphia. 82-6.
77. Levine, M.A., R.C. Daruwala, J.B. Park, S.C. Rumsey & Y. Wang (1998) *Nature* **395**: 231-3.
78. Negre-Salvayre, A., A. Affany, C. Harlton & R. Salvayre (1991) *Biochem. Pharmacol.* **42**: 450-3.
79. Levine, M., S. Rumsey, Y. Wang, J. Park, O. Kwon, W. Xu & N. Amano (1996) "Vitamin C". In: "Present knowledge in nutrition". Seventh Edition. E.E. Ziegler & L.J. Filer. ILSI Press, Washington DC.
80. Levine, M., K. Dhariwal, R. Welch, Y. Wang, & J.B. Park (1995) *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1347S-56S
81. Levine, M., C. Conry-Cantilena, Y. Wang, R.W. Welch, P.W. Washko, K.R. Dhariwal, J. Park, A. Lazarev, J.F. Graumlich, J. King & L.R. Cantilena (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3704-9
82. Levine, M & K. Morita (1985) "Ascorbic Acid in Endocrine systems". In: "Vitamins and Hormones". Vol 42. Ed. by Academic Press, USA.
83. Levine, M. (1999) "Vitamin C and optimal health". Presented at the February 25, 60th Annual Biology Colloquium, Oregon State University, Corvallis, Oregon.
84. Fox, M.R., R.M. Jacobs, A.O. Jones, B.E. Fry Jr, & C. L. Stone (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **355**: 249-61
85. Klein, F., B. Juhl & J.S. Christiansen (1995) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **55**(1): 53-9.
86. Branch, D.R. (1999) *Diabetes Care* (letter) **22**: 1218-8.
87. Auer, B.L., D. Auer & A.L. Rodgers (1998) *Eur. J. Clin. Invest.* **28**: 695-700.
88. Wandzilak, T.R., S.D. D'Andre, P.A. Davis & H.E. Williams (1994) *J. Urol.* **151**: 834-7.
89. Rivers, J.M. (1987) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **498**: 445-54.
90. Stein, H.B., A. Hasan, I.H. Fox (1976) *Ann. Int. Med.* **84**: 385-8.
91. Hornig, G., H. Weiser, F. Weber & O. Wiss (1973) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **43**: 28-33.
92. Gaby, A.R. (2000) "The myth of rebound scurvy". Ed. by Townsend Letter for Doctors, June N° 122.
93. Tsao, C.S. & S.L. Salimi (1984) *Med. Hypotheses* **13**: 303-10.
94. Wilson, J.D. (1998) "Vitamin deficiency and excess". *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th. (A.S. Fauci, E. Braunwald & K.J. Isselbacher, eds).Ed. McGraw Hill, NY.
95. Cochrane, W.A. (1965) *Can. Med. Assoc. J.* **93**: 893-9.
96. Klenner, F.R. (1971) *J. Appl. Nutr.* **23**: 61-88.
97. Dollery, C. (1991) "Therapeutic Drugs" Vol. 1. Ed. by Churchill Livingstone, London.
98. Kallner, A., D. Horing & D. Hartman (1982) "Kinetics of ascorbic acid in humans". In "Ascorbic acid: Chemistry, metabolism and uses" (P.A. Seib & B.M. Tolbert, eds.). Advances in Chemistry Series No.200, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 385-400
99. Kallner, A. (1987) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **498**: 418-23
100. Donnamaría, M.C., E. Caffarena & J.R. de Xammar Oro (1999) *J. Mol. Struct.* **489**: 19-27.
101. Milanesio, M., R. Bianchi, P. Ugliengo, C. Roetti & D. Viterbo (1997) *J. Mol. Struct.* **419**: 139-54
102. Reyd, R.S (1989) *J. Chem. Educ.* **66**: 344-5.