
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIUSEPPE BORRACINO, SILVIO DIPIERRO, FRANCA
TOMMASI, ORESTE ARRIGONI

**Ossido-riduzione dell'acido ascorbico e formazione di
AFR**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 72 (1982), n.3, p. 176–181.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1982_8_72_3_176_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1982_8_72_3_176_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biochimica vegetale. — Ossido-riduzione dell'acido ascorbico e formazione di AFR (*). Nota di GIUSEPPE BORRACCINO, SILVIO DIPIERRO, FRANCA TOMMASI e ORESTE ARRIGONI, presentata (**) dal Socio S. TONZIG.

SUMMARY. — Ascorbic Free Radical formation during the oxidation-reduction of the ascorbic acid system has been studied. It is known that AA oxidation is a two-step reaction each step removing one electron. The first oxidation product is a semiquinone-like free radical, i.e. Ascorbic Free Radical (AFR). We have shown that both enzymic and non-enzymic reduction of DHA to AA did not generate AFR.

DHA reduction thus seems to proceed by a single-step transfer of two electrons.

INTRODUZIONE

Il sistema dell'acido ascorbico è rappresentato da tre entità chimiche: l'acido ascorbico (AA), la forma ridotta; il deidroascorbico (DHA), la forma ossidata e l'« Ascorbic Free Radical » (AFR), il composto intermedio di ossidazione [1].

Il consumo di AA nel metabolismo cellulare è molto elevato, sia negli organismi che lo sintetizzano [2] che in quelli che lo assumono con la dieta [3, 4]. L'AA nella cellula funziona essenzialmente come donatore di elettroni e ciò determina una continua formazione sia di AFR che di DHA. La formazione di quest'ultimo rappresenta per la cellula una perdita netta di ascorbico poichè il DHA è riconvertito ad AA in misura molto limitata in tutti gli esseri viventi, anche in quelli dotati di DHA-riduttasi [5]. Al contrario, la formazione del semichinone radicale libero AFR come intermedio dell'ossidazione dell'ascorbico è un meccanismo che non determina una diminuzione del contenuto di AA poichè tutte le cellule sono dotate di un'efficiente AFR-riduttasi che catalizza la riduzione ad AA di grandi quantità di AFR [6].

I meccanismi di ossidazione che generano AFR sono molto importanti perchè da un lato consentono un efficiente trasferimento di elettroni dai piridin-nucleotidi ridotti al sistema dell'ascorbico attraverso l'AFR-riduttasi, e dall'altro assicurano una continua presenza di AFR che è un composto direttamente coinvolto in numerose reazioni metaboliche [7]. Mentre si conosce molto sui sistemi ossidanti l'AA che generano AFR [8, 9, 10, 11], sono molto scarse le nostre conoscenze sulla possibilità che si formi AFR nel processo di riduzione del DHA ad AA [12].

Scopo del presente lavoro è quello di verificare se si forma AFR durante la riduzione del DHA ad AA per via enzimatica oppure attraverso l'uso di diversi riducenti chimici.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Botanica dell'Università di Bari con il contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 marzo 1982.

MATERIALI E METODI

Preparazioni enzimatiche contenenti AFR-riduttasi erano ottenute omogeneizzando porzioni di tubero di topinambour (*Heliantus tuberosus*) in un mezzo contenente TRIS-HCl 50 mM, mannitolo 0,3 M, EDTA 1 mM, albumina 0,1%, cisteina 0,05% a pH 7,8. L'omogenato era sottoposto a centrifugazione frazionata e la frazione solubile usata come fonte di AFR-riduttasi [6].

Con la stessa tecnica erano ottenute preparazioni enzimatiche contenenti DHA-riduttasi da porzioni di tubero di patata (*Solanum tuberosum*).

L'attività AFR-riduttasica era saggiata misurando la velocità di ossidazione di NADH a 340 nm in una miscela di reazione contenente TRIS-HCl 50 mM pH 8, NADH 0,2 mM, enzima (circa 400 μ g di proteine), AA 1 mM e AA-ossidasi (vedi fig. 1) in un volume finale di 3 ml.

L'attività DHA-riduttasica era saggiata misurando la velocità di formazione di AA a 265 nm in una miscela di reazione contenente tampone fosfato 100 mM pH 6,3, enzima (circa 400 μ g di proteine), DHA 1 mM, GSH 2 mM in un volume finale di 3 ml.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La fig. 1 mostra che la formazione di AFR può facilmente essere evidenziata impiegando l'AFR-riduttasi, enzima che catalizza il passaggio di elettroni dal NADH all'AFR che è l'accettore specifico della reazione [6]. L'assorbanza a 340 nm di una miscela di reazione contenente NADH, AA e AFR-riduttasi

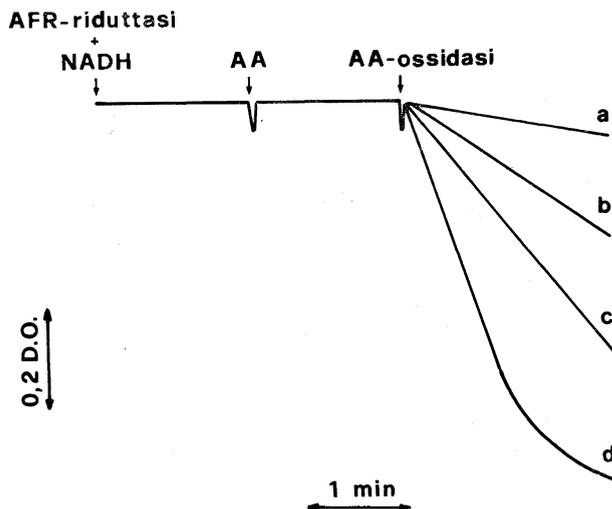


Fig. 1. - Attività AFR-riduttasica in estratti di tubero di topinambour misurata come diminuzione di densità ottica a 340 nm. La miscela di reazione contiene TRIS-HCl 50 mM pH 8, NADH 0,2 mM, enzima (circa 400 μ g di proteine), AA 1 mM e AA-ossidasi 0,1 U (a), 0,3 U (b), 0,6 U (c), 1 U (d) in un volume finale di 3 ml.

resta inalterata (cioè non si ha ossidazione di NADH) finchè non si aggiunge ascorbico ossidasi. Questo enzima, ossidando l'AA, mette in moto la formazione di AFR e di conseguenza si può avere il passaggio di elettroni dal NADH all'AFR ad opera dell'AFR-riduttasi. Come si vede, impiegando quantità crescenti di AA-ossidasi la velocità di ossidazione del NADH aumenta e ciò è dovuto alla maggiore velocità di produzione di AFR.

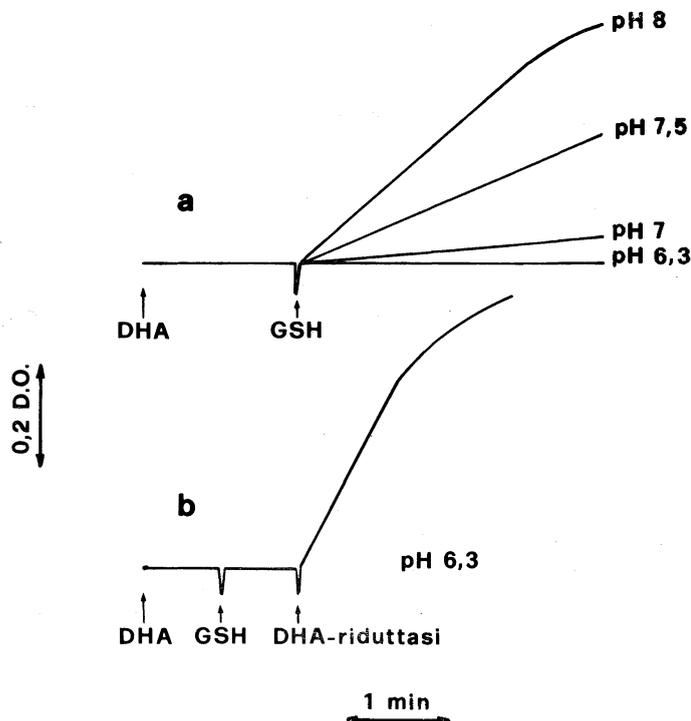


Fig. 2. - Riduzione del DHA non-enzimatica a diversi pH (a) ed enzimatica a pH 6,3 (b). La velocità di riduzione è misurata come incremento della densità ottica a 265 nm di una miscela di reazione contenente DHA 1 mM, GSH 2 mM, tampone fosfato 100 mM ai valori di pH indicati, DHA-riduttasi (curva b) in un volume finale di 3 ml.

Per poter vedere se la riduzione del DHA ad AA passa attraverso la formazione dell'intermedio AFR è necessario innanzitutto stabilire le condizioni sperimentali nelle quali si ha un'efficiente riduzione del DHA ad AA. Tale riduzione può avvenire non enzimaticamente usando composti riducenti quali glutatione ridotto (GSH), ditiotreitolo e boroidruro (NaBH_4). La velocità di riduzione è fortemente influenzata dal pH. Il GSH, ad esempio, non riduce praticamente il DHA al di sotto di pH 6,3. La velocità della reazione aumenta al crescere del pH, ma non è possibile operare a pH maggiori di 8 perchè a questi valori il DHA è instabile e si trasforma in dichetogulonico che non è riducibile ad AA.

A pH 8 (fig. 2) si ha una buona riduzione del DHA ed in queste condizioni, utilizzando il sistema AFR/AFR-riduttasi, abbiamo studiato se la riduzione del DHA ad AA comporta o no la formazione di AFR.

Dalla fig. 3 si osserva che a pH 8, in una miscela di reazione contenente DHA e GSH, non si ha ossidazione del NADH ad opera dell'AFR-riduttasi e ciò è verosimilmente dovuto alla mancata formazione di AFR durante la riduzione del DHA ad opera del glutatione. Infatti se si fosse formato l'AFR, avremmo dovuto osservare, in presenza sia di NADH che di AFR-riduttasi, l'ossidazione

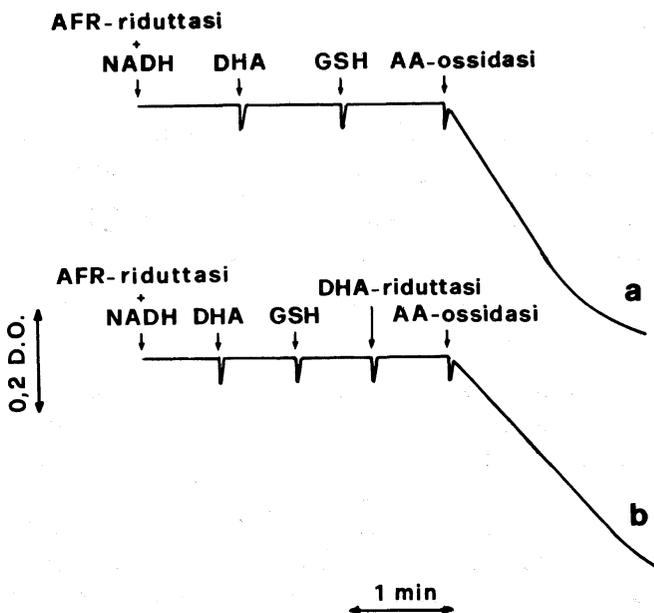


Fig. 3. - Mancanza di formazione di AFR durante la riduzione del DHA non-enzimatica a pH 8 (a) ed enzimatica a pH 6,3 (b). L'aggiunta di ascorbico ossidasi evidenzia la formazione di AFR per ossidazione dell'AA prodotto dalla riduzione del DHA ad opera del GSH.

del NADH e quindi una caduta di densità ottica a 340 nm. Si potrebbe pensare che nelle condizioni sperimentali adottate non si veda formazione di AFR perchè la quantità di DHA che viene ridotta ad AA è troppo piccola rispetto alla K_m della AFR-riduttasi per l'AFR. Non sembra essere così perchè ossidando l'AA prodotto con AA-ossidasi, si osserva una buona attività AFR-riduttasica. Questo dimostra che la quantità di DHA ridotto ad AA dal GSH è di un ordine di grandezza adeguato per osservare l'AFR eventualmente formato. Dati del tutto identici si ottengono riducendo il DHA con ditiotreitolo o boroidruro.

La mancata evidenza di formazione di AFR nel corso della riduzione non enzimatica del DHA ad AA a pH 8 potrebbe anche ritenersi dovuta al fatto che l'AFR in realtà si formi, ma sia velocemente dismutato in DHA ed AA secondo l'equazione $2 \text{AFR} \rightleftharpoons \text{AA} + \text{DHA}$ [13].

Abbiamo cercato di rispondere a questo interrogativo usando la DHA-riduttasi, enzima che catalizza il trasferimento di elettroni dal glutatione ridotto al deidroascorbico anche a pH 6,3, pH al quale non si ha riduzione non-enzimatica del DHA da parte del GSH. Come si vede (fig. 3 *b*) anche in queste condizioni non si ha nessuna evidenza di formazione di AFR.

CONCLUSIONI

I dati di questo lavoro dimostrano che non si ha formazione di AFR durante la riduzione del deidroascorbico ad acido ascorbico in tutte le condizioni sperimentali adottate e cioè:

- 1) quando il DHA è ridotto non-enzimaticamente a pH 8,0 utilizzando composti sulfidrilici riducenti quali il GSH e il ditiotreitolo;
- 2) quando il DHA è ridotto enzimaticamente a pH 6,3 dal GSH mediante reazione catalizzata dalla deidroascorbico riduttasi;
- 3) quando si usa come donatore di elettroni un composto completamente diverso quale il boroidruro.

Ci sembra di poter concludere che mentre l'ossidazione dell'AA avviene secondo una via a due tappe, ciascuna rimovente un elettrone, e porta alla formazione di AFR, la riduzione del deidroascorbico ad AA è un processo che presuppone il trasferimento contemporaneo di due elettroni. Peraltro la constatazione che l'AFR non si forma durante il processo di riduzione del DHA ad AA ci sembra degna di qualche considerazione. L'AFR ha maggiori possibilità metaboliche rispetto agli altri due composti del sistema dell'acido ascorbico, il DHA e l'AA. Infatti mentre l'AA funziona solo come agente riducente e il DHA come ossidante, l'AFR può agire sia da accettore che da donatore di elettroni. Inoltre l'AFR, al pari di tutti gli altri radicali liberi, è estremamente più reattivo come riducente della forma pienamente ridotta, cioè l'AA. È nota a questo riguardo la maggior efficacia dell'AFR rispetto all'AA nel ridurre il citocromo *c* ed il citocromo *b₅* [10, 14, 15]. È altrettanto noto che la riduzione da parte dell'AA dell'adrenocromo procede attraverso l'AFR [16] e AFR è richiesto per l'eliminazione dell'istamina [17]. Si può inoltre affermare che l'AFR svolge il suo ruolo più particolare e importante per il metabolismo nei processi di idrossilazione [18, 19, 20]. Infine l'AFR, in virtù della sua capacità di rimuovere un singolo elettrone da numerosi composti organici, può scatenare una sequenza di reazioni che portano alla formazione di radicali liberi. La cellula tuttavia è in grado di controllare in ogni momento questo processo, essendo provvista di un'efficiente AFR-riduttasi che converte l'AFR ad AA.

È allora evidente che se il metabolismo cellulare richiede AFR, la cellula può ottenerlo solo ossidando l'AA. Se è presente esclusivamente DHA, questo può essere utilizzato per la formazione di AFR soltanto dopo essere stato ridotto ad AA. È però da sottolineare che la riduzione del DHA ad AA nella cellula

è modesta. Infatti la riduzione non-enzimatica ad opera del GSH è poco efficiente a causa del pH non favorevole del citoplasma e quella enzimatica è scarsamente coinvolta poichè la DHA-riduttasi è assente in tutte le cellule animali ed in molte di quelle vegetali [6].

Tutto ciò sta quindi a significare che la formazione di DHA nella cellula rappresenta sì un'utilizzazione irreversibile dell'ascorbico, ma la quantità di DHA che compare è in realtà una misura dell'utilizzazione di AFR. In altri termini è l'ossidazione dell'AFR che rappresenta la tappa dell'effettivo consumo di vitamina C nel metabolismo cellulare e che porta alla formazione di DHA.

Comunque la quantità di DHA che compare dà una misura dell'AA che deve essere ingerita con la dieta negli organismi che non lo sintetizzano ovvero sintetizzata negli organismi in grado di farlo, al fine di ripristinare nella cellula il livello ottimale della vitamina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. LEWIN (1976) - *Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential*, « Academic Press London » (N. Y.), p. 5.
- [2] O. ARRIGONI, R. ARRIGONI-LISO e G. CALABRESE (1975) - « *Nature* », 256, 513-514.
- [3] M. J. CLINE (1975) - *The White Cell*, « Harvard Univ. Press », p. 49.
- [4] L. PAULING (1974) - « *Proc. Natl. Acad. Sci.* », 71, 4442-4446.
- [5] M. YAMAGUCHI e M. A. JOSLYN (1951) - « *Plant Physiol.* », 26, 757-772.
- [6] O. ARRIGONI, S. DIPIERRO e G. BORRACCINO (1981) - « *FEBS Lett.* », 125, 242-244.
- [7] S. LEWIN (1976) - *Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential*, « Academic Press London », (N.Y.), p. 40.
- [8] C. LAGENCANTZ (1964) - « *Acta Chem. Scand.* », 18, 562.
- [9] I. YAMAZAKI (1962) - « *J. Biol. Chem.* », 237, 224-229.
- [10] I. YAMAZAKI e L. PIETTE (1961) - « *Biochim. Biophys. Acta* », 50, 62-69.
- [11] Z. DISCHE e H. ZIL (1951) - « *Am. J. Ophthalmology* », 38, 104-113.
- [12] A. NASON, W. D. WOSILAIT e A. J. TERREL (1954) - « *Arch. Biochem. Biophys.* », 48, 233-235.
- [13] G. V. FOERSTER, W. WEIS e H. STAUDINGER (1965) - « *Ann. Chem.* », 690, 166-169.
- [14] K. KRISCH e H. STAUDINGER (1959) - « *Biochem. Zeitsch.* », 331, 195-208.
- [15] T. HARA e S. MINAKAMI (1969) - « *Proc. Symp. on Enzyme Chem. Kanazawa 1968* », p. 21.
- [16] G. L. MATTOCK (1965) - « *J. Chem. Soc.* », 4728-4735.
- [17] E. ZUSKIN, A. J. LEWIS e A. BOUHUYS (1973) - « *J. Allergy Clin. Immunol.* », 51, 218-226.
- [18] S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD e B. B. BRODIE (1954) - « *J. Biol. Chem.* », 208, 731-739.
- [19] D. C. BORG (1965) - « *Proc. Natl. Acad. Sci.* », 53, 829-836.
- [20] W. E. BLUMBERG, M. GOLDSTEIN, E. LAUBER e J. PEISACH (1965) - « *Biochim. Biophys. Acta* », 99, 187-190.