

Actividad catalítica diferencial de enzimas del ciclo ascorbato-glutación en los frutos de dos genotipos de *Myrciaria dubia*

Differential catalytic activity of enzymes of the ascorbate-glutathione cycle in fruits of two genotypes of *Myrciaria dubia*

Cinthy Acuña¹, Luis A. Cerdeira¹, Roberson Ramírez¹, Marianela Cobos^{1,2}, Jorge L. Marapara¹, Jorge Angulo¹, Sixto A. Imán³ y Juan C. Castro⁴

Recibido: junio 2015

Aceptado: junio 2015

RESUMEN

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (camu camu) es un frutal amazónico de interés económico por los diversos compuestos beneficiosos para la salud. Entre estos, sobresale por presentar un alto contenido de vitamina C (ascorbato). Sin embargo, se desconocen los factores que controlan el metabolismo, transporte y acumulación de esta vitamina en *M. dubia*. Por estas razones, el objetivo fue evaluar la actividad catalítica de enzimas del ciclo ascorbato-glutación en los frutos de dos genotipos de *M. dubia* que difieren en su contenido de ascorbato. Los frutos maduros fueron obtenidos de la Colección de Germoplasma de *M. dubia* del Instituto Nacional de Innovación Agraria. Se extrajeron las enzimas y se midió su actividad catalítica por análisis espectrofotométrico. Todas las enzimas del ciclo ascorbato-glutación (ascorbato peroxidasa [APX], monodehidroascorbato reductasa [MDHAR], dehidroascorbato reductasa [DHAR] y glutación reductasa [GR]) mostraron actividad catalítica en la pulpa y cáscara, pero estas actividades fueron significativamente diferentes entre los genotipos *Md-02,04* y *Md-60,02*. En conclusión, la actividad catalítica diferencial de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación influyen en la variación del contenido de ascorbato en los frutos de *M. dubia*, de tal forma que un alto contenido de ascorbato está relacionado con una menor actividad catalítica de APX y mayor actividad catalítica de las enzimas MDHAR, DHAR y GR.

Palabras claves: actividad enzimática, camu camu, frutal amazónico, monodehidroascorbato, vitamina C.

ABSTRACT

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (camu camu) is an Amazonian fruit of economic interest because their beneficial compounds for health. Despite these, highlights by the high content of vitamin C (ascorbate). However, to date the factors that control metabolism, transport and accumulation of this vitamin in *M. dubia* are unknown. For these reasons, the objective was to evaluate the catalytic activity of enzymes of the ascorbate-glutathione cycle in fruits of two genotypes of *M. dubia* which differ in their ascorbate content. Ripe fruits were collected from the Germplasm Collection of *M. dubia*, National Institute of Agro Innovation. Enzymes were extracted and their catalytic activity measured by spectrophotometric analysis. All enzymes of the ascorbate-glutathione cycle (ascorbate peroxidase [APX], monodehydrosacorbate reductase [MDHAR], dehydroascorbate reductase [DHAR], and glutathione reductase [GR]) showed catalytic activity in the pulp and peel, but these activities were

¹Unidad Especializada de Biotecnología. Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

²Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética. Universidad Científica del Perú (UCP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

³Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

⁴Unidad Especializada de Biotecnología. Cirna. UNAP. Pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. juanccgomez@yahoo.es

significantly different between the *Md-02*, *04* and *Md-60,02* genotypes. In conclusion, the differential catalytic activity of enzymes of the glutathione-ascorbate cycle influence in the ascorbate content variation in fruits of *M. dubia*, so that a high content of ascorbate is associated with a lower catalytic activity of APX and higher catalytic activity of the enzymes MDHAR, DHAR, and GR.

Key words: enzymatic activity, camu camu, Amazonian fruit, monodehydroascorbate, vitamin C.

INTRODUCCIÓN

La vitamina C (ácido L-ascórbico o ascorbato) cumple funciones trascendentales al aportar múltiples beneficios para la salud humana. Por ejemplo, es un excelente antioxidante, porque brinda protección a los componentes celulares frente a la acción de los radicales libres (Ginter *et al.*, 2014; Halliwell, 1996). Además, actúa como cofactor esencial de enzimas de la familia prolil 4-hidroxilasas, las que catalizan reacciones de hidroxilación involucradas en la síntesis de colágeno (Barnes y Kodicek, 1972; Peterkofsky, 1991; Pinnel *et al.*, 1987; Szarka y Lórinicz, 2014). Debido a este último rol se le atribuye su participación en la prevención de enfermedades como la artritis y la artrosis (Chang *et al.*, 2015). También, contribuye en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Jain *et al.*, 2015), permite combatir diversos tipos de cáncer (Uetaki *et al.*, 2015; Valko *et al.*, 2006) y reduce los riesgos de padecer anemia, porque modula el metabolismo del hierro estimulando la síntesis de ferritina, inhibiendo la degradación lisosomal de ferritina y disminuyendo el eflujo celular del hierro (Lane y Richardson, 2014).

Por tanto, para mantener un buen estado de salud, el hombre debe consumir ascorbato, ya que es incapaz de sintetizarlo. Esta incapacidad se debe a la deficiencia de la enzima L-gulono-1,4-lactona oxidasa debido a mutaciones en el gen que codifica esta enzima (Linster y Van Schaftingen, 2007; Nishikimi y Yagi, 1991). Consecuentemente, nuestra principal fuente de

ascorbato son las plantas, las que tienen la capacidad de sintetizarla mediante varias vías metabólicas como la del mio-inositol, de la L-gulosa, del ácido urónico y de la D-manosa/L-galactosa (Smirnoff, 2000; Smirnoff *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 1998). Esta última vía biosintética, que también es denominada la vía de Smirnoff-Wheeler, es considerada la más importante (Wheeler *et al.*, 1998). Además, las plantas mediante el ciclo ascorbato-glutatión (figura 1) regeneran el ascorbato, es decir pueden convertir las formas oxidadas e inactivas (monodehidro-

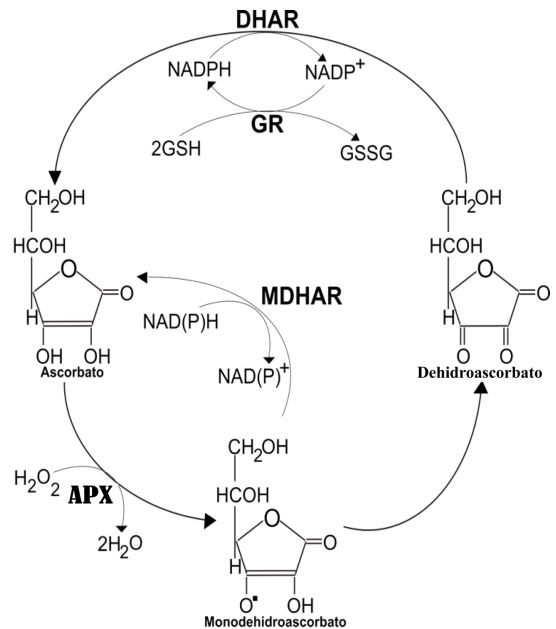


Figura 1. Ciclo ascorbato-glutatión de las plantas con las enzimas y metabolitos participantes. APX: ascorbato peroxidasa, MDHAR: monodehidroascorbato reductasa, DHAR: dehidroascorbato reductasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotido, NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato.

ascorbato y dehidroascorbato) en la forma reducida y activa (ascorbato). Esto es posible gracias a la actividad catalítica de las enzimas monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) cuyos donadores de electrones son NADH y NADPH, respectivamente (Szarka *et al.*, 2012).

En la Amazonía peruana disponemos de los frutos de *M. dubia*, que son una excelente fuente natural de ascorbato. Esto ha sido demostrado desde hace más de cinco décadas por varios reportes científicos, que indican que los frutos de esta especie pueden contener más de 2 g de ascorbato por cada 100 g de pulpa (Alves *et al.*, 2002; Bradfield y Roca, 1964; Imán *et al.*, 2011); e incluso se ha demostrado que la cáscara puede contener de 1,5 a 2,0 veces más que la pulpa (Castro *et al.*, 2013). A pesar de estas excepcionales cualidades, una de las principales dificultades que presenta es la amplia variación en la producción de ascorbato entre plantas de *M. dubia* (Castro *et al.*, 2013); en parte esto se atribuye a la expresión genética y por ende a la actividad catalítica diferencial de enzimas de la vía biosintética D-manosa/L-galactosa (Castro *et al.*, 2015). Sin embargo, la actividad catalítica diferencial de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión también pueden influir en la variación del contenido de ascorbato en *M. dubia*. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad catalítica de enzimas del ciclo ascorbato-glutatión en diferentes tejidos de *M. dubia* y entre dos genotipos de plantas que difieren en el contenido de ascorbato de sus frutos.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de muestras botánicas

Los frutos maduros de dos genotipos de *M. dubia* (Md-02,04 y Md-60,02) previamente caracterizados por producir bajo (<0,9 g/100

g tejido) y alto (>1,5 g/100 g tejido) contenido de ascorbato, respectivamente (Castro *et al.*, 2013), fueron obtenidos de la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, Estación Experimental Agraria San Roque - Loreto del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA); ubicado en el kilómetro 25,5 de la carretera Iquitos-Nauta (3°57'22,95"S y 73°24'46,91"O).

Extracción de enzimas

La extracción de la ascorbato peroxidasa (APX) se realizó según Ma y Cheng (2003) y Vanacker y Foyer (1998), y consistió en triturar en un mortero 10 mg de la muestra vegetal (pulpa o cáscara) que contenía 1,2 mL de tampón de extracción [HEPES 100 mM pH 6,5, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) 5 mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 10 mM, ascorbato sódico 5 mM, PMSF 1 mM y polivinilpirrolidona (PVP) 3%]. El homogenizado se centrifugó a 21 380 x g por 15 min. El sobrenadante se transfirió a microtubos de 1,5 mL. Asimismo, para la extracción de las enzimas monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) se procedió de acuerdo a Ma y Cheng (2003), empleando un tampón que contenía fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 2%, tritón X-100 0,25% (v/v), β-mercaptoetanol 0,3% y PVP 3%.

Medición de la actividad catalítica de las enzimas

La actividad de todas las enzimas se realizó en un volumen final de 1 mL y empleando como control negativo todos los componentes de cada reacción enzimática (para APX, MDHAR, DHAR y GR) y 30 μL del extracto enzimático tratado con proteinasa K (10 μg/mL) a 37 °C por 15 min y luego sometido a ebullición (para desnaturalizar las enzimas del extracto) por 10 min.

La actividad catalítica de la APX se midió de acuerdo con Rao *et al.* (1996), con los siguientes reactivos: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, ascorbato sódico 0,4 mM, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,3 mM y 30 μ L del extracto enzimático. La reacción se evaluó midiendo la disminución de la absorbancia a 290 nm (conversión de ascorbato a monodehidroascorbato) cada 5 seg por 5 min a 25 °C en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0).

La actividad catalítica de la MDHAR se midió mediante una reacción enzimática acoplada según Hossain *et al.*, (1984). En este sistema, primero el ascorbato es oxidado a monodehidroascorbato por acción de la ascorbato oxidasa y posteriormente el monodehidroascorbato es reducido a ascorbato con la consecuente oxidación del NADH por la monodehidroascorbato reductasa del extracto enzimático. Los componentes de la reacción fueron: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, ascorbato oxidasa 0,5 U/mL, ascorbato sódico 1 mM, NADH 0,2 mM y 30 μ L del extracto enzimático. La actividad catalítica se monitoreó registrando la disminución de la absorbancia a 340 nm (conversión de $NADH \rightarrow NAD^+$) cada 5 seg por 5 min a 25 °C en un espectrofotómetro.

La actividad catalítica de la DHAR se midió según el protocolo propuesto por Foyer y Halliwell (1976), empleando los siguientes reactivos: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, dehidroascorbato 0,5 mM, glutatión reducido (GSH) 1 mM y 30 μ L del extracto enzimático. La reacción catalítica se monitoreó registrando el aumento de la absorbancia a 265 nm (síntesis de ascorbato) cada 5 seg por 5 min a 25 °C en un espectrofotómetro.

La actividad catalítica de la GR se evaluó según Edwards *et al.* (1990), en una reacción con los siguientes reactivos: fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM,

glutatión oxidado (GSSG) 0,25 mM y 30 μ L del extracto enzimático. La reacción se midió mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm (oxidación del $NADPH \rightarrow NADP^+$ y reducción del $GSSG \rightarrow 2$ GSH) cada 5 seg por 5 min a 25 °C en un espectrofotómetro.

Cuantificación de proteínas totales

Se realizó por el método de Bradford (1976), empleando soluciones estándares de albúmina de suero bovino en el rango de 30 a 500 μ g/mL. Brevemente, consistió en homogenizar 1 mL del reactivo de Bradford (azul de comassie G-250 0,25%, etanol absoluto 5% y ácido ortofosfórico 10%) con 50 μ L de NaOH 1 M y 20 μ L del estándar o del extracto enzimático. Las lecturas de absorbancia a 596 nm se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys 6,0). Con la ecuación de la recta (con $R^2 > 0,99$) y los datos de absorbancia de las muestras, se calculó la concentración de proteínas totales.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos tales como determinación de los promedios, desviación estándar, Anova y HSD de Tukey se realizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics v 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión mostraron actividad catalítica en la pulpa y cáscara de los frutos de ambos genotipos de *M. dubia* (figura 2). Estos resultados nos indican que tanto la pulpa como la cáscara tienen la capacidad antioxidante y la de regenerar el ascorbato. La primera, es debido a la acción de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), que reduce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a H_2O con la concomitante conversión del ascorbato a monodehidroascorbato (Gill y

Tuteja, 2010). Mientras que la segunda, se atribuye a la acción catalítica de las enzimas MDHAR y DHAR que reducen el monodehidroascorbato y dehidroascorbato a ascorbato, respectivamente. Estos procesos enzimáticos son favorecidos gracias a la acción de la GR que reduce el GSSG a GSH (figura 1). En general, el ciclo ascorbato-glutatión es un sistema eficaz para la regeneración y por ende para mantener los niveles apropiados de ascorbato, debido a la constante demanda por los múltiples roles fundamentales que cumple en los tejidos de las plantas (Smirnoff, 2000; Smirnoff y Wheeler, 2000).

Como se indicó previamente, todas las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

mostraron actividad catalítica en los tejidos analizados, sin embargo, es evidente que existen actividades enzimáticas diferenciales entre ambos genotipos de *M. dubia* (figura 2). Por ejemplo, en el caso de la APX se observa que la actividad de esta enzima está significativamente incrementada tanto en la pulpa como en la cáscara del genotipo *Md-02,04*, que se caracteriza por su bajo contenido de ascorbato. En contraste, las enzimas MDHAR y DHAR muestran actividades catalíticas significativamente mayores en ambos tejidos del genotipo *Md-60,02*, el cual sobresale por su mayor contenido de ascorbato. Finalmente, en el caso de la enzima GR se observa que solo a nivel de la cáscara la actividad de esta enzima fue

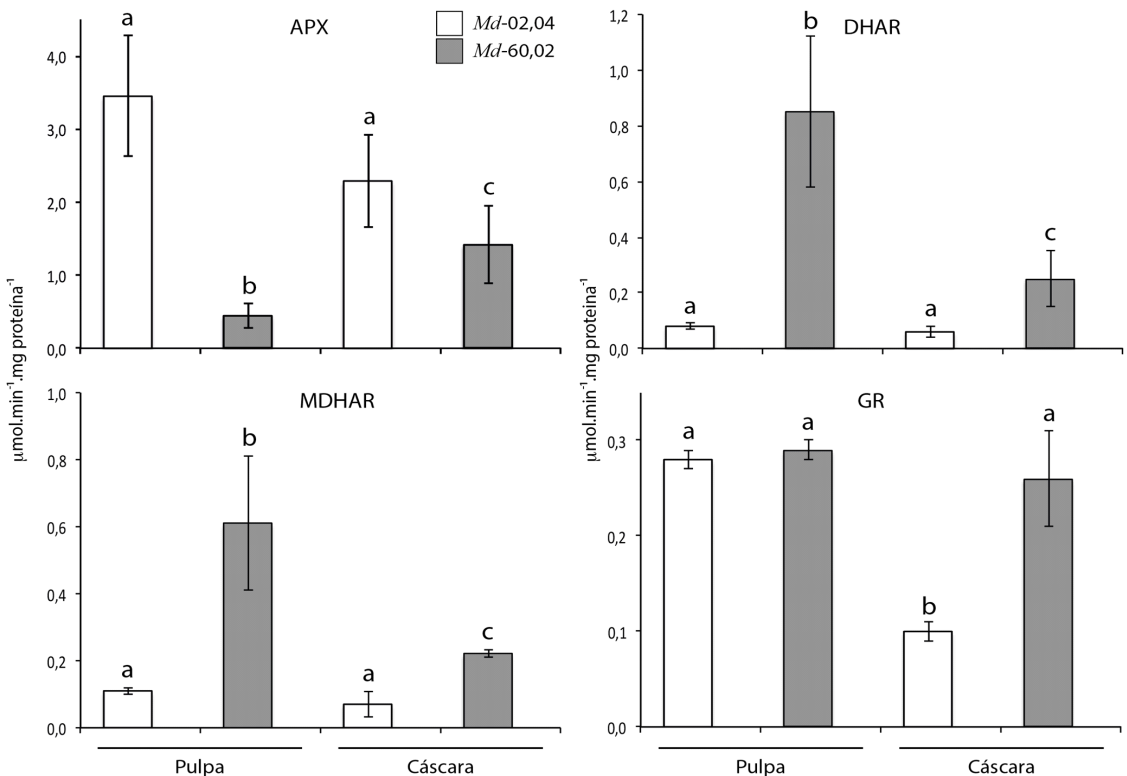


Figura 2. Actividad catalítica específica de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión en la pulpa y cáscara en dos genotipos de *M. dubia* caracterizados por producir bajo (*Md-02,04*: <0,9 g/100 g tejido) y alto contenido (*Md-60,02*: >1,5 g/100 g tejido) de ascorbato. APX: ascorbato peroxidasa, MDHAR: monodehidroascorbato reductasa, DHAR: dehidroascorbato reductasa, GR: glutatión reductasa. Diferentes letras sobre las columnas indican que existen diferencias estadísticas significativas en la actividad de las enzimas entre los tejidos de los genotipos analizados ($p < 0,05$).

mayor en el genotipo *Md-60,02*. Los resultados corroboran investigaciones previas realizadas por Li *et al.* (2010), quienes demuestran que las enzimas MDHAR y DHAR desempeñan papeles importantes en mantener altos niveles de ascorbato en varias etapas de maduración de los frutos del kiwi. Similarmente, reportes recientes muestran que la sobreexpresión de los transgenes que codifican las enzimas MDHAR, DHAR y GR induce un aumento significativo del contenido de ascorbato y protege contra el estrés oxidativo a las plantas modificadas genéticamente (Ding *et al.*, 2009; Foyer *et al.*, 1995; Le Martret *et al.*, 2011).

En conjunto, los resultados nos sugieren que la actividad catalítica diferencial de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación pueden estar influyendo en el contenido total de ascorbato en los tejidos de *M. dubia*. Por tanto, los genes que codifican las enzimas de esta vía metabólica pueden ser candidatos apropiados para la generación de variedades genéticamente mejoradas de esta especie, caracterizadas por ser hiperproductoras de ascorbato.

CONCLUSIONES

La actividad catalítica diferencial de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación influyen en la variación del contenido de ascorbato en los frutos de *M. dubia*, de tal forma que un alto contenido de ascorbato está relacionado con una menor actividad catalítica de APX y mayor actividad catalítica de las enzimas MDHAR, DHAR y GR.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por proporcionar los fondos para realizar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves R, Filgueiras H, Moura C, Araujo N, Almeida A. 2002. Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): a Rich Natural Source of Vitamin C. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort., 46: 11-13.
- Barnes MJ, Kodicek E. 1972. Biological hydroxylations and ascorbic acid with special regard to collagen metabolism. Vitamins and Hormones, 30: 1-43.
- Bradfield RB, Roca A. 1964. Camu camu - a fruit high in ascorbic acid. Journal of the American Dietetic Association, 44: 28-30.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Castro JC, Cobos M, Maddox JD, Imán SA, Egoávil A, Torres J, Gutiérrez F. 2015. Gene expression and enzyme activities of the D-mannose/L-galactose pathway influence L-ascorbic acid content in *Myrciaria dubia*. Biologia Plantarum, 1-5.
- Castro JC, Gutiérrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Cobos M, Imán SA. 2013. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* (camu camu). Revista de La Sociedad Química del Perú, 79(4): 319-330.
- Chang Z, Huo L, Li P, Wu Y, Zhang P. 2015. Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress. *Molecular Medicine Reports*.
- Ding S, Lu Q, Zhang Y, Yang Z, Wen X, Zhang L, Lu C. 2009. Enhanced

- sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant Molecular Biology*, 69(5): 577-592.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2): 278-284.
- Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1): 21-25.
- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L. 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology*, 109(3): 1047-1057.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Ginter E, Simko V, Panakova V. 2014. Antioxidants in health and disease. *Bratislavské Lekárske Listy*, 115(10): 603-606.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, 16(1): 33-50.
- Hossain MA, Nakano Y, Asada K. 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 25(3): 385-395.
- Imán S, Bravo L, Sotero V, Oliva C. 2011. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Scientia Agropecuaria*, 2(3): 123-130.
- Jain AK, Mehra NK, Swarnakar NK. 2015. Role of antioxidants for the treatment of cardiovascular diseases: Challenges and opportunities. *Current Pharmaceutical Design*, 21(30):1-15.
- Lane DJR, Richardson DR. 2014. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption! *Free Radical Biology & Medicine*, 75: 69-83.
- Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent GD, Dix PJ. 2011. Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered antioxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9(6): 661-673.
- Li M, Ma F, Liang D, Li J, Wang Y. 2010. Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumulation in kiwi. *PloS One*, 5(12): e14281.
- Linster CL, Van Schaftingen E. 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal*, 274(1): 1-22.
- Ma F, Cheng L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Science*, 165(4): 819-827.

- Nishikimi M, Yagi K. 1991. Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6 Suppl): 1203S-1208S.
- Peterkofsky B. 1991. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6 Suppl): 1135S-1140S.
- Pinnel SR, Murad S, Darr D. 1987. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Archives of Dermatology*, 123(12): 1684-1686.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110(1): 125-136.
- Smirnoff N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3): 229-235.
- Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 437-467.
- Smirnoff N, Wheeler GL. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 291-314.
- Szarka A, Lőrincz T. 2014. The role of ascorbate in protein folding. *Protoplasma*, 251(3), 489-497.
- Szarka A, Tomasskovics B, Bánhegyi G. 2012. The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4): 4458-4483.
- Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. 2015. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Scientific Reports*, 5: 13896.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1):1-40.
- Vanacker H, Foyer CH. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, 117(3): 1103-1114.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393(6683): 365-369.