

# Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos

\*ISABEL CFR FERREIRA, RUI MV ABREU

*CIMO – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança*

## RESUMO

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres dizemos que o organismo está em stress oxidativo, e nestas situações os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal e conduzindo a várias doenças. Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS). A exposição dos organismos a radicais livres, conduziu ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos para os eliminar. Estas defesas são a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de ROS em condições aeróbias. Alguns produtos naturais com actividade antioxidante, podem auxiliar o sistema protector endógeno. Nesta perspectiva, os antioxidantes presentes na dieta assumem grande importância como possíveis agentes protectores, reduzindo os danos oxidativos. São aqui descritos alguns desses agentes antioxidantes, os fitoquímicos, compostos bioactivos provenientes de diferentes partes de plantas (sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias, ervas) envolvidos na redução do risco de doença, como o cancro. Foram já identificados mais de 5000 fitoquímicos, no entanto, grande parte destes compostos é ainda desconhecida, sendo a sua identificação essencial para a compreensão da sua contribuição na saúde, ao serem incluídos na dieta.

**Palavras-chave:** Stress oxidativo • antioxidantes • fitoquímicos

*Aceite para publicação: 15 de Março de 2007*

## \*Correspondência:

CIMO/ESAB, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança. Tel. 273 303 219 • Fax 273 325 405 • iferreira@ipb.pt

## ABSTRACT

Maintenance of equilibrium between free radical production and antioxidant defences (enzymatic and non enzymatic) is an essential condition for normal organism functioning. When this equilibrium has a tendency to the production of free radical we say that the organism is in oxidative stress. In this situation, excess free radicals may damage cellular lipids, proteins and DNA, inhibiting his normal function and leading to various diseases. In aerobic organisms, the free radicals are constantly being produced during the normal cellular functioning, mainly in the form of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS). Exposition of the organism to free radicals has led to the development of endogenous defence mechanisms to eliminate them. These defences were the response of evolution to the inevitability of ROS production in aerobic conditions. Natural products with antioxidant activity may help the endogenous defence system. In this perspective the antioxidant present on the diet assume a major importance as possible protector agents reducing oxidative damage. Phytochemicals with antioxidant activity, obtained from different plant parts (seeds, cereals, vegetables, fruits, leaves, roots, spices, herbs), and involved in disease risk reduction are review. More than 5000 phytochemicals were already discovered, but most of these compounds remain yet to be discovered. Their identification and the study of their contribution to health is essential.

**Keywords:** Oxidative Stress • antioxidants • phytochemicals

*Accepted for publication: 15 March 2007*

## 1. STRESS OXIDATIVO

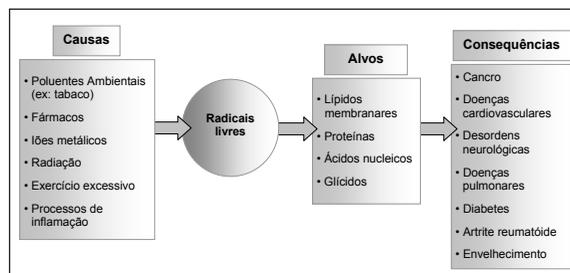
Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (1).

Em concentrações baixas ou moderadas, os ROS podem ser benéficos para a célula, estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (2). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS, ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (3). A este desequilíbrio chamamos stress oxidativo e nestas situações os ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal (1, 4, 5).

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (Fig. 1). De facto, a produção não controlada de radicais livres foi já associada como causa, ou como estando relacionada com mais de uma centena de doenças incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras (1, 6, 7). A sobreprodução de ROS tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento (8).

Considerando a estimativa de que 70% das doenças crónicas e dos custos associados podem ser prevenidos, facilmente se compreende a primordial importância do conhecimento, e se possível, do controle da produção excessiva de ROS (9). Este controle pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando comportamentos conducentes a uma maior produção de radicais livres e ROS como o tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (8).



**Figura 1.** Principais causas e consequências da acção dos radicais livres.

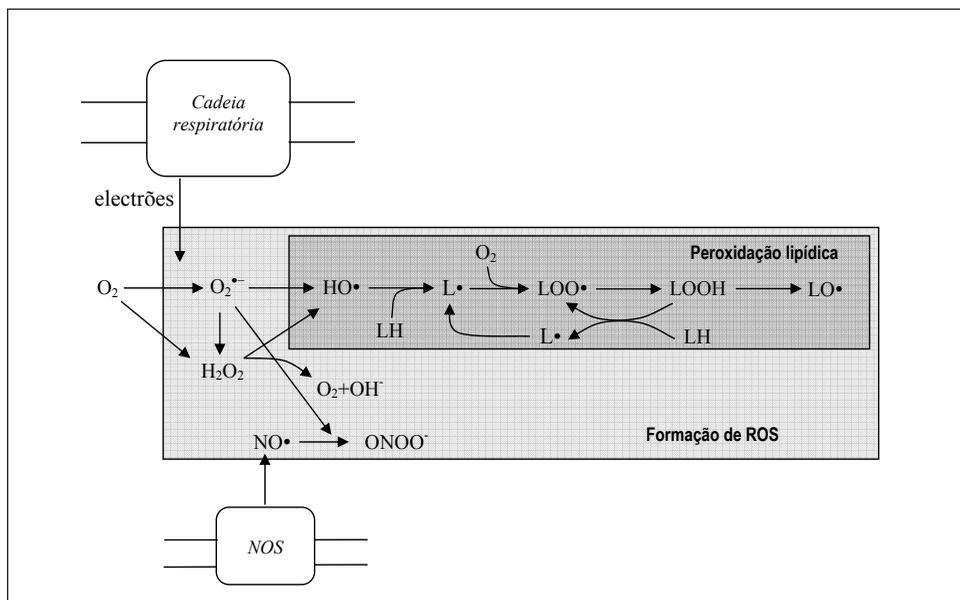
## 2. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO (ROS)

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados, isto é, tem orbitais com apenas um electrão (10). Sob esta forma, o composto apresenta uma forte reactividade com a maioria das espécies químicas. Os radicais livres derivados de oxigénio são genericamente conhecidos como espécies reactivas de Oxigénio (ROS) e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (11). Assim, podemos observar que apesar do Oxigénio molecular ( $O_2$ ) ser essencial para a vida aeróbia, pode ser tóxico em determinadas condições. A este fenómeno chamamos o “paradoxo do oxigénio” (12).

Várias vias de produção de ROS são de seguida descritas e apresentadas na Figura 2.

A adição de um electrão ao Oxigénio molecular ( $O_2$ ) forma o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que é normalmente considerado o ROS “primário”. O anião superóxido é principalmente produzido nas mitocôndrias, onde ocorre uma pequena, mas contínua, “fuga” de electrões da cadeia respiratória. Estes electrões, ao invés de reduzir o  $O_2$  a moléculas de água, reduzem o  $O_2$  a anião superóxido. Estima-se que esta “fuga” de electrões ocorra em aproximadamente 1 a 3% dos electrões que passam pela cadeia respiratória mitocondrial (13), sendo que o anião superóxido foi já implicado em várias doenças (14). O  $O_2^{\bullet-}$  pode ainda ser formado por acção de vários sistemas enzimáticos existentes na célula (2, 12).

Apesar do anião superóxido não ser um radical muito activo, pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais normalmente designados ROS “secundários”, entre os quais o peróxido de hidrogénio



**Figura 2.** Esquema representativo de algumas das principais reacções que envolvem espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de nitrogénio (RNS). A cadeia respiratória produz aniões superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que podem ser transformados em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidróxido ( $HO^{\bullet}$ ). Estes radicais podem reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica originando radicais lipídicos ( $L^{\bullet}$ ), radicais peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ) e lípidos hidroperóxidos ( $LOOH$ ). A sintase do óxido nítrico mitocondrial (NOS) produz óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), que combina com o anião superóxido para produzir peroxinitrílo ( $ONOO^{\bullet}$ ). Quando em excesso, todos estes ROS podem causar danos mitocondriais e celulares.

( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) (15). O radical hidroxilo tem um tempo de vida muito curto mas é muito reactivo, sendo mesmo o ROS que causa mais danos, nomeadamente por atacar moléculas de DNA, danificando tanto purinas como pirimidinas, bem como o esqueleto de desoxirribose do DNA (15). Eventuais danos permanentes no material genético provocados por stress oxidativo podem representar o primeiro passo em situações de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (1).

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Como a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, os ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres. A este ataque chamamos peroxidação lipídica e promove a formação de vários tipos de ROS (16) (Fig. 2).

A peroxidação lipídica começa normalmente com a extracção de um átomo de hidrogénio de uma cadeia poliinsaturada de um lípido (LH), por intermédio da acção de uma espécie reactiva como o  $HO^{\bullet}$  ou o  $H_2O_2$ , formando-se um radical lipídico

( $L^{\bullet}$ ). Este ataque é seguido pela adição de uma molécula de  $O_2$  formando-se um radical peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ). Se este radical não for neutralizado pelas defesas antioxidantes, vai rapidamente desencadear um fenómeno de propagação da peroxidação lipídica reagindo com outros lípidos adjacentes e formando lípidos hidroperóxidos ( $LOOH$ ). Estes compostos podem facilmente ser decompostos para formar novamente radicais  $L^{\bullet}$ .

Esta série de reacções de peroxidação lipídica iniciada pelos ROS, com a produção de radicais peroxilos e lipídicos, são colectivamente designadas por reacções de propagação em cadeia e, se não forem travadas, podem provocar danos potencialmente muito superiores aos ROS que iniciaram a reacção. A mitocôndria é então um local sensível à acção destrutiva dos ROS, embora seja um dos locais da célula onde também existe um maior número de defesas antioxidantes (2, 17, 18).

Também é importante salientar que existem radicais que contêm Nitrogénio designados espécies reactivas de nitrogénio (RNS). O principal RNS é o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (Fig. 2). Este radical é produzido em tecidos biológicos por sintases de óxido nítrico (NOS) ao metabolizar arginina a citrulina (2, 19). O

NO• é muito abundante e funciona como molécula de sinalização numa grande variedade de processos fisiológicos, tais como: neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação da resposta imunitária (2, 20). A sobreexpressão de RNS é designada stress nitrosamínico e pode conduzir à nitrosilação de proteínas, inibindo a sua função (21). Em células do sistema imunitário, durante processos inflamatórios, o NO• é produzido conjuntamente com o anião superóxido. Estes dois radicais reagem com formação de peroxinitrilo (ONOO-), que é um potente agente oxidante e pode provocar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (22).

### 3. DEFESAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENAS

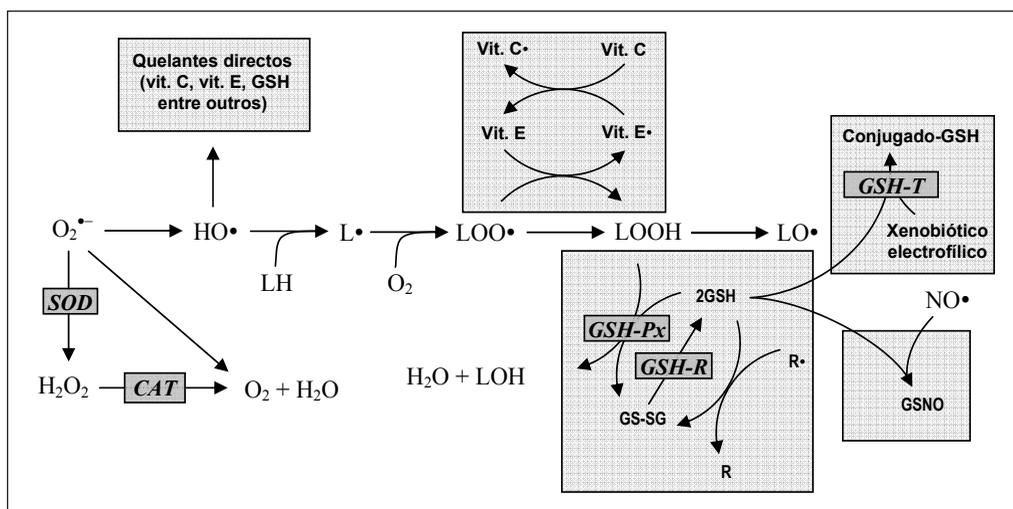
A exposição do organismo a radicais livres, provenientes de diversas fontes, levou o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres (23). Estas defesas foram a resposta da evolução à inevitabilidade da existência de radicais de oxigénio em condições de vida aeróbia. Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas (Fig. 3).

As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se espalhadas por todo o

organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Exemplo destas defesas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPH-Px), a glutatona redutase (GPH-R), entre outras. Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutatona (GSH) o  $\alpha$ -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (1).

A SOD converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias. Outra enzima importante é a GSH-R que regenera a GSH que é utilizada pela CAT como dadora do hidrogénio necessário para a redução do peróxido de hidrogénio em água (24). Os lípidos hidroperóxidos podem ser transformados em alcoóis (LOH) também pela GSH-Px.

A GSH é um tripéptido de baixo peso molecular, composta por glutamato, cisteína e glicina. Tem um grupo tiol na cisteína e é muito abundante sendo o principal tampão redox intracelular. Como defesa antioxidante desempenha várias funções. É um quelante de radicais livres (HO•, H2O2, LOO• e ONOO-), quer reagindo directamente com estes, quer indirectamente como co-factor de enzimas antioxidantes como a GSHPx e a GSH-T, entre outras. No processo de



**Figura 3.** Principais defesas endógenas antioxidantes da célula. Os ROS e os RNS estão representados de forma semelhante à figura 2. As defesas antioxidantes estão representadas em retângulos escuros e as enzimas antioxidantes representadas em itálico. ROS: anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical hidróxido ( $HO^\bullet$ ), lípidos membranares (LH), radical lipídico ( $L^\bullet$ ), radical peróxido ( $LOO^\bullet$ ) e lípido hidroperóxido (LOOH), óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ), alcoóis (LOH). Defesas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPH-Px), glutatona redutase (GPH-R), glutatona (GSH), glutatona dissulfito (GS-SG),  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E (vit. E), radical de vitamina E (vit. E•), vitamina C (vit. C), radical de vitamina C (vit. C•), não radical (R), radical ( $R^\bullet$ ), S-nitrosoglutatona (GSNO).

neutralização dos radicais livres, a GSH é oxidada com a formação do radical GS•. Este radical livre também é reactivo mas rapidamente reage com um segundo radical GS• formando a molécula glutatona dissulfito (GS-SG), que não é oxidante. A GS-SG é novamente reduzida a duas GSH pela enzima GPH-R. A GSH é utilizada para regenerar ao seu estado activo, outras moléculas antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E.

A capacidade da GSH para regenerar as moléculas antioxidantes mais importantes está ligada ao estado redox do par Glutatona dissulfito/Glutatona (GS-SG/GSH) (25). A GSH pode também reagir com uma grande variedade de xenobióticos electrofilicos e, conjuntamente com a enzima GSH-T, torna estes compostos mais solúveis e mais facilmente excretáveis. Um dos conjugados formados é a S-nitrosoglutatona (GSNO), que é formada pela reacção da GSH com o óxido nítrico (NO•) (26).

A vitamina E (vit. E) é uma vitamina lipossolúvel que, por se encontrar nas membranas, previne mais facilmente a peroxidação lipídica, e pode ser encontrada em 8 formas diferentes, das quais o  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais activa em humanos. O ROS (radical hidroxilo, radical peróxido, etc) reage como a vit. E, formando um radical fenólico pouco reactivo (vit. E•). A vitamina C (vit. C) reage com o radical fenólico da vitamina E entretanto formado (vit. E•), regenerando-a à sua forma inicial. Como o radical vit. E•, o radical da vitamina C (vit. C•) não é uma espécie reactiva porque o seu electrão desemparelhado é energeticamente estável (26, 27).

#### 4. FITOQUÍMICOS

Para além das defesas endógenas, existe uma panóplia de moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa.

Alguns produtos naturais com actividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema protector endógeno, podendo ser utilizados como nutracêuticos (28). Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores que ajudem a corpo humano na redução dos danos

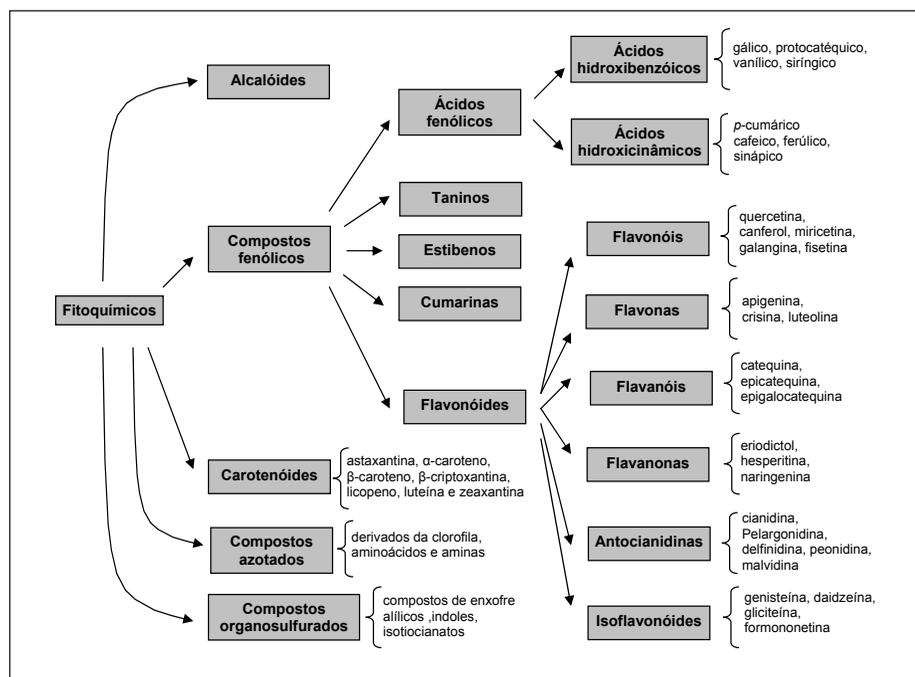
oxidativos. Os fitoquímicos são classificados como compostos bioactivos provenientes de diferentes partes das plantas, tais como, sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (29, 30), e estão relacionados com a redução do risco de ocorrência de várias doenças crónicas, nomeadamente vários tipos de cancro.

Sendo o stress oxidativo induzido por radicais livres, responsável por várias dessas doenças crónicas, os fitoquímicos presentes em frutos e vegetais assumem cada vez mais uma enorme importância. Já foram identificados mais de 5000 fitoquímicos, no entanto, uma grande percentagem destes compostos é ainda desconhecida, sendo importante a sua identificação para melhor compreender a sua contribuição para a saúde ao serem incluídos na nossa dieta (31).

Os fitoquímicos englobam carotenóides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos; alcalóides; compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e amins) e compostos organossulfurados: (isotiocianatos, indoles, compostos de enxofre alílicos) (32) (Fig. 4). Os fitoquímicos mais estudados são os compostos fenólicos e os carotenóides.

Foram descritos vários efeitos antioxidantes dos polifenóis presentes no chá: aumento da resistência dos eritrócitos ao stress oxidativo (33), bloqueio de radicais superóxido e hidroxilo e inibição de alterações oxidativas em lipoproteínas de baixa densidade (34), diminuição da concentração sérica de colesterol total e malondialdeído (indicador da peroxidação lipídica) e aumento da concentração sérica de lipoproteína de alta densidade, efeitos benéficos no tratamento de doença coronária, hipertensão e diabetes tipo 2, e inibição do crescimento e indução de apoptose em várias linhas celulares tumorais (26, 35). Para além destes estudos, a capacidade antioxidante de compostos fenólicos presentes em outras matrizes como a azeitona de mesa (36) ou as folhas de oliveira (37) tem também sido estudada.

Os cogumelos são também conhecidos como alimentos funcionais e como uma fonte para o



**Figura 4.** Principais classes de fitoquímicos naturais. Para alguns grupos mais estudados são indicados exemplos concretos (31).

desenvolvimento de fármacos e nutracêuticos (38-40) nomeadamente de compostos antioxidantes (40-44). Efectivamente, os cogumelos contêm vários compostos fenólicos reconhecidos como excelentes antioxidantes devido à sua capacidade para bloquear radicais livres por transferência de um único electrão e às excelentes propriedades redox dos seus grupos hidroxilos fenólicos (45).

O Nordeste de Portugal é uma das regiões europeias com maior diversidade de cogumelos silvestres comestíveis, muitos dos quais com enorme importância gastronómica. O nosso grupo de investigação tem-se interessado, nos últimos anos, pela avaliação de propriedades bioactivas de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal, nomeadamente actividade antioxidante.

Existe pouca informação relativa à actividade antioxidante de cogumelos silvestres europeus tendo sido o nosso grupo a descrever, pela primeira vez, o poder redutor e o efeito bloqueador em radicais livres de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) de duas espécies de cogumelos portugueses silvestres comestíveis (*Lactarius deliciosus* e *Tricholoma portentosum*) e a sua correlação com a porção do carpóforo utilizada (chapéu ou pé) (46). Também demonstramos que os

componentes antioxidantes de extractos de cogumelos portugueses de outras três espécies (*Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Agaricus arvensis*) podem proteger a membrana de eritrócitos incubados com AAPH [di-hidroclorato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)], e reduzir a extensão da destruição de  $\beta$ -caroteno neutralizando o radical de linoleato e outros radicais livres formados no sistema. Foi ainda estabelecida uma correlação entre a actividade antioxidante obtida e o teor em fenóis, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno (47).

Andrade *et al.* identificaram alguns compostos bioactivos nos cogumelos silvestres comestíveis *Cantharellus cibarius* Fr., conservado em quatro condições diferentes (desidratado, congelado, preservado em azeite e em vinagre), tais como: seis compostos fenólicos (ácido 3-, 4- e 5-O-cafeoilquinico, ácido cafeico, ácido p-cumárico e rutina) e cinco ácidos orgânicos (ácidos cítrico, ascórbico, málico, shiquímico e fumárico) (48). Os ácidos orgânicos: cítrico, cetoglutárico, málico, succínico, oxálico, ascórbico, químico, shiquímico e fumárico; foram também encontrados nos cogumelos comestíveis *Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, *Gyroporus castaneus*, *Lactarius deliciosus*, *Suillus collinitus* e *Xerocomus chrysenteron* (49).

Para além dos compostos fenólicos, também os carotenóides possuem actividade antioxidante importante para a saúde humana. Efectivamente, o papel fotoprotector dos carotenóides está relacionado com a sua capacidade de bloquear e inactivar espécies reactivas de oxigénio formadas na presença de luz e ar. Os carotenóides conseguem reagir com radicais livres e tornarem-se, eles próprios, radicais estáveis devido à deslocalização dos electrões desemparelhados ao longo da sua cadeia conjugada poliénica. Por exemplo, o  $\beta$ -caroteno reage com um radical peroxilo formando um radical que interrompe a cadeia de propagação das espécies reactivas de oxigénio (26).

A astaxantina, zeaxantina e luteína são excelentes antioxidantes lipossolúveis que bloqueiam radicais livres. Os carotenóides, em concentrações adequadas, previnem a oxidação lipídica relacionada com o stress oxidativo (31).

Todos estes dados são importantes atendendo ao facto de cerca de dois terços das mortes relacionadas com tumores poderem ser evitadas através de um estilo de vida saudável. Assim uma dieta adequada que envolva o consumo de antioxidantes, pode minimizar os riscos de cancro. Alguns autores sugerem também a ocorrência de efeitos aditivos e sinérgicos por parte dos fitoquímicos presentes em frutos e vegetais, e que levam a uma considerável actividade antioxidante e anticancerígena (31). Uma dieta rica nestes alimentos é altamente benéfica devido à complexa mistura de fitoquímicos presente e, um único antioxidante, por mais eficaz que seja, não pode substituir a combinação de fitoquímicos naturais existente nos alimentos. Assim, os compostos antioxidantes/bioactivos são mais convenientemente adquiridos a partir de uma dieta alimentar completa do que a partir de quaisquer suplementos dietéticos.

## REFERÊNCIAS

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**:44-84.
- Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; **893**:13-8.
- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; **1**:441-5.
- Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 1998; **333** (Pt 3):519-25.
- Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:13147-52.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984; **2**:1095.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; **16**:33-50.
- Lachance PA, Nakat Z, Jeong WS. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 2001; **17**:8358.
- Fries JF, Koop CE, Beadle CE, Cooper PP, England MJ, Greaves RF et al. Reducing health care costs by reducing the need and demand for medical services. The Health Project Consortium. *N Engl J Med* 1993; **329**:321-5.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **899**:136-47.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990; **8**:95-108.
- Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **899**:1-14.
- Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res* 1998; **28**:601-9.
- Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem* 2005; **12**:2601-23.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; **186**:1-85.
- Mehrotra S, Kakkar P, Viswanathan PN. Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Radic Biol Med* 1991; **10**:277-85.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; **108**:652-9.
- Abreu RM, Santos DJ, Moreno AJ. Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**:1022-30.
- Ghaffourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005; **26**:190-5.

20. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; **65**:1865-74.
21. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004; **385**:1-10.
22. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:1716-23.
23. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; **6**:391-7.
24. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005; **4**:5.
25. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; **333**:19-39.
26. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; **18**:872-9.
27. Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, Comp P, Grammas P, Hamdheydari L et al. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004; **36**:1-15.
28. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc* 1998; **57**:9-13.
29. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Tech* 1995; **6**:75-82.
30. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 2005; **89**:191-8.
31. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**:S517-S520.
32. Hall CA, Cuppett SL. Structure-activities of natural antioxidants. In: Aruoma OI, Cuppett SL, editors. *Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts*. AOCS Press; 1997. 2-29.
33. Youdim KA, Shukitt-Hale B, MacKinnon S, Kalt W, Joseph JA. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1523**:117-22.
34. Fang YZ, Sun CP, Tian XH, Cong JH. Effect of lu-duo-wei on scavenging superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *Am J Chin Med* 1998; **26**:153-8.
35. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1998; **19**:611-6.
36. Pereira JA, Pereira APG, Ferreira ICFR, Valentao P, Andrade PB, Seabra R et al. Table Olives from Portugal: Phenolic Compounds, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity. *J Agric Food Chem* 2006; **54**:8425-31.
37. Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, Bastos ML, Pereira JA. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry* 2007; **103**:188-95.
38. Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *Euro Food Res Tech* 2007; **225**:151-6.
39. Chang ST. Global impact of edible and medicinal mushrooms of human welfare in the 21st century: non-green revolution. *Free Rad Res Commun* 1999; **1**:1-7.
40. Yang JH, Linb HC, Maub JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 2002; **77**:229-235.
41. Cheung LM, Cheung PCK. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 2005; **89**:403-409.
42. Lo KM, Cheung PCK. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry* 2005; **89**:533-539.
43. Mau J-L, Chang C-N, Huang S-J, Chen C-C. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry* 2004; **87**:111-118.
44. Yen GC, Hung CY. Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Res Int* 2000; **33**:487-92.
45. Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 1987; **2**:289-94.
46. Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* 2007; **100**:1511-6.
47. Barros L, Ferreira M-J, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 2007; **103**:413-19.
48. Valentão P, Andrade PB, Rangel J, Ribeiro B, Silva BM, Baptista P et al. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *J Agric Food Chem* 2005; **53**:4925-31.
49. Valentão P, Lopes G, Valente M, Barbosa P, Andrade PB, Silva BM et al. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *J Agric Food Chem* 2005; **53**:3626-30.