

## PESQUISA DE PRODUTOS NATURAIS: PLANTAS E RADICAIS LIVRES

### NATURAL PRODUCTS RESEARCH: PLANTS AND FREE RADICALS

José C. R. Velloso<sup>1,2,\*</sup>, Vanessa de F. Barbosa<sup>1</sup>, Olga M. M. de F. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Araraquara-SP, Brasil

<sup>2</sup> UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara-SP, Brasil

Recebido em 24/04/2007 - Aceito em 15/10/2007

\*Autor para correspondência e-mail: [josevellosa@yahoo.com.br](mailto:josevellosa@yahoo.com.br)

**RESUMO:** Os fagócitos, em especial os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, produzem ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) através da redução do oxigênio por um elétron, com gasto de NADPH. A partir deste processo, grande número de oxidantes altamente microbicidas são formados, tais como HOCl,  $HO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ . Tais oxidantes são produzidos com a finalidade de combater microrganismos invasores, mas eles também provocam danos e estão envolvidos em grande número de patologias. A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de compostos e sistemas antioxidantes. A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. A pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância. No estudo do potencial antioxidante das amostras deve-se considerar que: i) um composto deve ser testado em concentrações disponíveis *in vivo* e ii) ao avaliar os antioxidantes, deve-se utilizar pelo menos uma espécie relevante biologicamente. Deve-se perguntar se o antioxidante age diretamente sobre a ERO ou ele inibe a sua geração e ainda, se ele age indiretamente regulando defesas antioxidantes endógenas.

**PALAVRAS-CHAVE:** antioxidantes, produtos naturais, radicais livres, espécies reativas do oxigênio

**ABSTRACT:** Phagocytes, mainly polymorphonuclear neutrophils leucocytes, yield superoxide radical ( $O_2^{\bullet -}$ ), expending NADPH. By this process, many reactive species, such as HOCl,  $HO^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$ , are generated. These oxidants are made to fight microorganisms, but they are involved in many pathologies. Reactive species and free radicals generation are equilibrated by antioxidants. The search of new medicines turns natural products research an important option for discovering molecules with different biological activities. Natural products research is relevant for discovering new medicines and molecules able to fight oxidant species. In evaluating the antioxidant potential of substances, it is important considerate: i) a compound should be tested at concentrations achievable *in vivo* and ii) when assaying putative antioxidants, one should use biologically relevant ROS. It is important to ask if it works directly over the oxidant or it works by regulating endogenous antioxidants defenses.

**KEY WORDS:** antioxidants, natural products, free radicals, reactive oxygen species

### INTRODUÇÃO

Antioxidantes naturais são de grande interesse em diversas áreas, incluindo alimentos (conservantes) e farmacologia (proteção do organismo contra o dano oxidativo). Produtos naturais vêm tendo, atualmente, ampla aplicação terapêutica com a difusão da idéia de que são mais seguros do que medicamentos sintéticos e, inclusive, são fontes naturais de substâncias antioxidantes.

Considerando-se o crescente uso de substâncias naturais na terapêutica, a importância de processos geradores de radicais livres em organismos vivos e a participação da enzima mieloperoxidase (MPO) em tais processos, bem como as patologias nas quais tais espécies exercem papel fundamental e os resultados

promissores alcançados em nossas pesquisas com extratos de plantas e seus metabólitos secundários, realizadas no Instituto de Química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus de Araraquara, acreditamos na importância de se escrever sobre o assunto na forma deste artigo de revisão que deverá auxiliar nas pesquisas realizadas nesta área.

É claro o envolvimento de espécies oxidantes formadas pelos fagócitos em muitas condições patológicas. Portanto, o desenvolvimento de fármacos que antagonizem a ação de tais espécies, bem como sua geração, pode prevenir danos observados nas patologias em que tais espécies estão envolvidas. Em virtude da importância deste tipo de pesquisa para a área de saúde em geral destacamos a necessidade de que sejam divulgadas e estimuladas as pesquisas sobre o potencial terapêutico de diferentes plantas brasileiras quanto a suas possíveis ações sobre radicais livres e/ou agentes oxidantes, bem como processos enzimáticos nos quais os mesmos são gerados e, ainda, processos *in vivo* em que há danos provocados por tais espécies. Para tanto, acreditamos ser necessário traçar o perfil de ação dos produtos naturais sobre diferentes agentes envolvidos no estresse oxidativo através de estudos realizados em sistemas químicos (não enzimáticos), sistemas bioquímicos (enzimáticos), sistemas *ex-vivo* (celulares) e sistemas *in vivo*.

## LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS

Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos são as primeiras células em seres humanos a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico contra infecções. Estas células migram dirigidas por gradientes quimiotáticos até o local da inflamação, onde elas reconhecem e fagocitam o patógeno invasor. Os patógenos são expostos a um arsenal de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas em seus grânulos citoplasmáticos. Os neutrófilos apresentam quatro tipos de grânulos, que contêm diferentes enzimas e proteínas. O conteúdo destes grânulos é liberado gradualmente no fagolisossoma, ou no meio extracelular, após a ativação dos neutrófilos. A elevação de íons cálcio intracelular inicia a degranulação. Para a secreção do conteúdo de grânulos terciários e vesículas secretórias é necessária uma elevação moderada do nível de cálcio no citoplasma (para cerca de 0,25  $\mu\text{M}$ ). Estes tipos de grânulos contêm albumina, gelatinase, colagenase e outras proteínas. Para a liberação do conteúdo de grânulos secundários é necessária uma elevação maior no nível de cálcio no citoplasma (para cerca de 0,7  $\mu\text{M}$ ). Neste caso são secretadas enzimas direcionadas ao combate do patógeno, tendo por função a destruição de estruturas da parede celular. Os grânulos azurófilos apresentam níveis elevados de mieloperoxidase, a qual juntamente com a NADPH oxidase de membrana está envolvida na geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e oxidação de biomoléculas (ARNHOLD, 2004). A ativação de neutrófilos por estímulos endógenos (frações do complemento, citocinas, etc.), ou por microrganismos, é seguida da ativação de uma enzima transmembrana que promove aumento do consumo do oxigênio para a produção de ânion superóxido, o precursor para uma série de espécies reativas do oxigênio (MATHY-HARTERT et al., 1998).

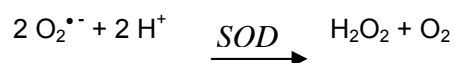
Fagócitos, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, quando estimulados, elevam sensivelmente sua taxa de consumo de oxigênio no *oxidative burst*. A geração de espécies químicas com alto potencial de reatividade (espécies reativas do oxigênio – ERO; Esq. 1) como resultado do *oxidative burst* em neutrófilos, é essencial para a defesa contra microrganismos na fagocitose (BRIHEIM et al., 1984). Duas enzimas-chave estão envolvidas na explosão oxidativa dos fagócitos, produzindo derivados do oxigênio: **i)** NADPH oxidase, um complexo enzimático de membrana, que catalisa a redução monovalente do oxigênio molecular a ânion superóxido; **ii)** a mieloperoxidase (MPO), que utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto a HOCl (CAPELLÈIRE-BLANDIN, 1998). Os leucócitos fagócitos são células especializadas que contêm grandes quantidades de componentes da NADPH oxidase e produzem ânion superóxido em abundância. Outros tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais e células do músculo liso, também são capazes de produzirem ânion superóxido, mas elas o fazem em baixas quantidades (FRIDOVICH, 2001).

### Ânion Superóxido

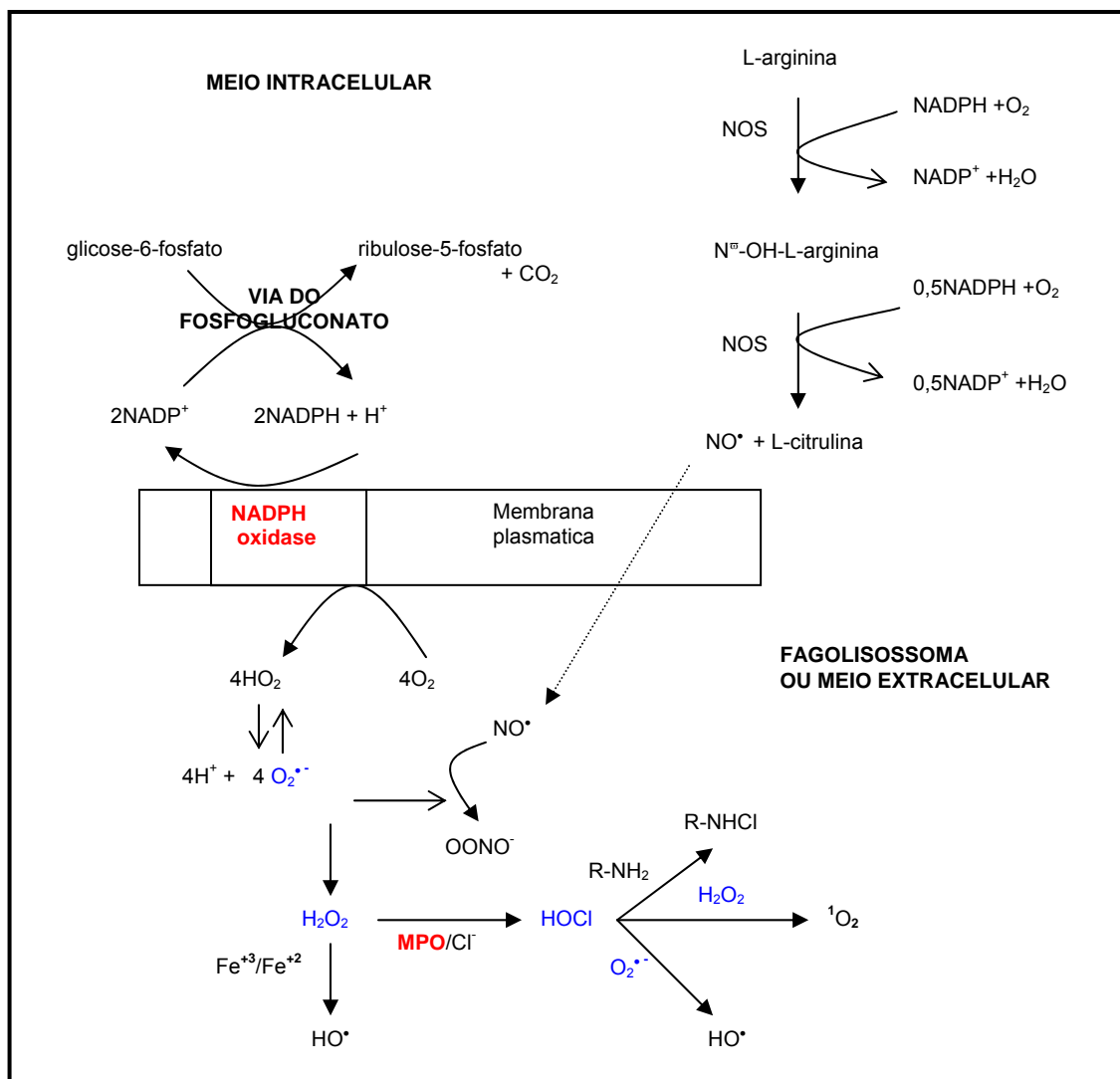
Pode ser escrito  $\text{O}_2^{\bullet -}$  ou  $\text{O}_2^-$  e é formado após a primeira redução monoelétrica do oxigênio; ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; 1986). Tem sido observada lesão biológica associada a sistemas geradores de superóxido, seja enzimático, fagocítico ou químico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

### Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

A maior parte do oxigênio consumido é convertida em peróxido de hidrogênio por dismutação do radical ânion superóxido, seja espontânea ou pela ação da superóxido dismutase (SOD).



Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um metabólito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxil (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é altamente tóxico para as células, pois tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon  $\text{Fe}^{++}$  (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).



**Esquema 1: Possibilidades de geração de ERO no *oxidative burst* de neutrófilos (MACMICKING et al., 1997)**

### Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é formado pela oxidação de íons cloreto, catalisada pela mieloperoxidase em presença de peróxido de hidrogênio (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). O HOCl pode ser considerado como o mais abundante oxidante gerado por leucócitos do sangue (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). O ácido hipocloroso é um oxidante extremamente forte e além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato (WEISS, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; EATON, 1993), é capaz de gerar outras ERO, tais como, oxigênio singlete e radical hidroxil via sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (WEISS, 1989; LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). O HOCl apresenta ações: i) protetora do organismo, à medida que participa do processo de destruição de microrganismos, mas, ao mesmo tempo, ii) agressora aos tecidos, pois nem células de mamíferos nem de bactérias podem detoxificar o HOCl por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996).

A mieloperoxidase é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolípidos de membranas celulares, além de catalisar a geração de HOCl e assim favorecer injúria celular (WEISS, 1989). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY et al., 1994), sugerindo função de oxidantes clorados nos processos aterogênicos (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). Neste contexto, o HOCl pode modificar lipoproteínas de baixa densidade

para uma forma aterogênica, aparentemente como resultado da oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (HAZEL & STOCKER, 1993; HAZEL et al., 1994). O desenvolvimento de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o HOCl, como sugerem alguns autores para drogas anti-inflamatórias (WASIL et al., 1987), rifampicina e tetraciclina (WASIL et al., 1988) e captopril (ARUOMA et al., 1991), podem ajudar no combate à injúria tecidual (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). O seqüestro farmacológico do HOCl será terapêuticamente significativo se, na concentração da droga *in vivo*, a reação com o ácido hipocloroso for rápida o bastante para proteger as moléculas-alvo biologicamente importantes do ataque pelo HOCl (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996).

### Cloraminas

O HOCl forma grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias, prontamente disponíveis em sistemas biológicos (THOMAS et al., 1986; WEISS, 1989). Tais cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. A monocloramina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), formada pela reação entre HOCl e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio HOCl (BABIOR, 2000). O  $\beta$ -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos (ZGLICZYNSKI et al., 1971) e principal alvo nestas células, reage com o HOCl formando taurina cloramina (TauCl). As cloraminas, particularmente a monocloramina, estão relacionadas à injúria gástrica observada na presença de *Helicobacter pylori*, que produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que produzem ácido hipocloroso (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996).

### Oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )

O estado excitado singlete do oxigênio não é um radical, visto não ter os elétrons desemparelhados, mas reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como lipídeos de membrana. Pode ser produzido através da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com HOCl ou pela dismutação espontânea do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990):

### Radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ )

É um dos mais reativos radicais conhecidos. Pode ser gerado a partir da reação do HOCl e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ou pelas reações de Fenton e Harber-Weiss. A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^\bullet$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Assim, se o radical hidroxil for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Além disso, o radical hidroxil pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) e iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (lipoperoxidação) das membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

### Óxido Nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) e Peróxinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ )

Em meio biológico as diferentes espécies formam-se rapidamente a partir do momento que a óxido nítrico sintase (NOS) torna-se cataliticamente ativa (MACMICKING et al., 1997). A NOS é a enzima responsável pela produção endógena de óxido nítrico através da oxidação de uma molécula de L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina (esquema 1; MACMICKING et al., 1997). Existem duas formas de NO sintase: i) a constitutiva, com baixa atividade, está presente no endotélio vascular e sistema nervoso central e produz baixas quantidades de óxido nítrico como molécula sinalizadora; ii) a indutiva, que possui alta atividade e é produzida por fagócitos quando estes são estimulados (BABIOR, 2000). O óxido nítrico, um radical gasoso lipossolúvel e hidrossolúvel, é uma espécie reativa do nitrogênio que, em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outras espécies reativas (MACMICKING et al., 1997). O peróxinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ ), produto formado pela reação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) é um potente oxidante, com propriedades similares ao radical hidroxil, e reage com íon  $\text{H}^+$  formando ONOOH que após se decompõe em  $\text{HO}^\bullet$  e radical dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ).

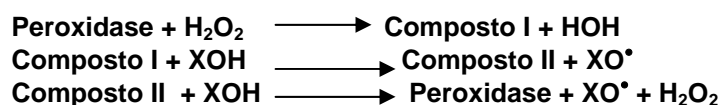
### Radical hidroperóxil ( $\text{HO}_2^{\bullet-}$ )

Representa a forma protonada do radical superóxido; existem evidências de que este seja mais reativo do que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

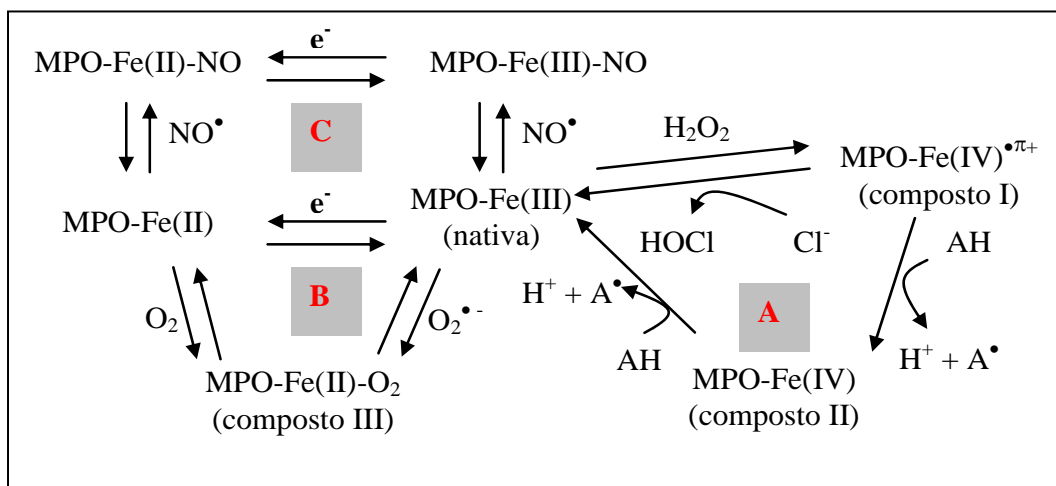
### PEROXIDASES

As peroxidases são enzimas que oxidam uma variedade de xenobióticos através do peróxido de hidrogênio (SAUNDERS, 1973). A enzima nativa contém um grupamento heme, geralmente ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Fe(III). A quinta posição de coordenação na porção proximal do heme está ocupada por um resíduo de histidina. A sexta posição de coordenação permanece livre na enzima nativa na porção distal do heme (O'BRIEN, 2000). Peroxidases são encontradas tanto em animais como em vegetais, sugerindo que tais enzimas devam ser uma parte essencial de todos os seres vivos (BRUNETTI & FARIA-OLIVEIRA, 1995). As peroxidases de plantas, como a *horseradish peroxidase*, consistem de cadeias polipeptídicas contendo cerca de 300 resíduos de aminoácidos e o heme ligado não covalentemente. As

peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente (O'BRIEN, 2000). A oxidação de xenobióticos (XOH) por peroxidases pode ser representada pelo ciclo de reações a seguir:

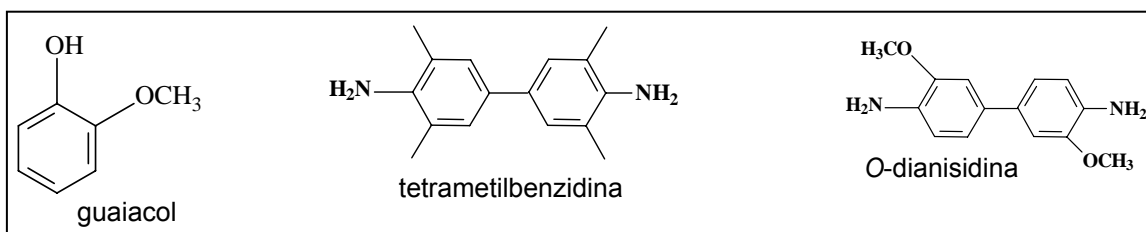


A peroxidase de raiz forte (HRP) é, provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta "rábano silvestre - raiz forte", da qual provém seu nome. Essa enzima tem uma massa molecular de 42,1 KDa, é uma hemoproteína cujo grupo prostético, a protoporfirina IX, está ligada não-covalentemente à parte protéica da molécula (O'BRIEN, 2000). A família de peroxidases humanas inclui: mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar (SPO), peroxidase da tireóide (TPO) e a prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS). A histidina distal das peroxidases de mamíferos age como um catalisador do tipo ácido/básico auxiliando a desprotonação do hidroperóxido e a protonação da água após a clivagem da ligação "oxigênio-oxigênio" (O'BRIEN, 2000). A TPO é responsável por catalisar a iodinação dos resíduos de tirosina da tireoglobulina e também por catalisar a formação da tiroxina. MPO, EPO e LPO são encontradas, respectivamente, em grânulos de neutrófilos (lisossomos), grânulos de eosinófilos e nas células secretórias das glândulas exócrinas. A MPO e a EPO são secretadas para o fagolisossoma e para o plasma, enquanto a LPO é secretada para o leite, saliva e lágrima. Elas são capazes de oxidar respectivamente cloreto, brometo ou tiocianato (O'BRIEN, 2000). A mieloperoxidase é um constituinte dos grânulos azurófilos de neutrófilos e, correspondendo a cerca de 5% da massa seca total (ZUURBIER et al., 1992), é secretada no meio extracelular e fagolisossomal. Está envolvida no sistema enzimático microbicida dos fagócitos (ANDREWS & KRINSKY, 1986; ARNHOLD, 2004), sendo que, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação de íons  $\text{Cl}^-$  com a formação de HOCl (HARRISON & SCHULTZ, 1976; PODREZ et al., 2000). A MPO tem sua síntese durante os estágios mielocíticos e promielocítico da maturação de granulócitos (ANDREWS & KRINSKY, 1986). As fontes reconhecidas de mieloperoxidase são os neutrófilos e monócitos, sendo que em macrófagos teciduais ela é usualmente considerada ausente (ROS et al., 1978). Entretanto, a MPO parece atuar em macrófagos, onde se observa a ocorrência do *oxidative burst* (LEFKOWITZ et al., 1992). Alguns trabalhos sugerem que os macrófagos apresentem conteúdo de MPO adquirida de neutrófilos por dois mecanismos possíveis: i) engolfamento de neutrófilos pelos macrófagos, ou ii) engolfamento da MPO liberada pelos neutrófilos no sítio inflamatório (RODRIGUES et al., 2002). Alguns autores descrevem a capacidade de certos macrófagos em expressar mieloperoxidase quando estimulados por certas citocinas, como o fator estimulador de colônias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF), em alguns processos patológicos, como a aterogênese (SUGIYAMA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2002). A estrutura da MPO compreende uma hemoproteína glicosilada de cerca de 144 KDa, catiônica em pH fisiológico, com ponto isoelétrico (pI) maior do que 11 (ANDREWS & KRINSKY, 1986). A MPO é constituída por duas cadeias idênticas unidas por ponte dissulfeto. Cada subunidade apresenta uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Ambas as subunidades apresentam um grupamento heme, sendo que estes operam independentemente na oxidação de íons cloreto. Esta enzima apresenta uma peculiaridade frente às demais peroxidases no que diz respeito ao seu grupamento heme. Este apresenta uma distorção como resultado da ligação covalente da protoporfirina IX ao resíduo de metionina da posição 243 (Met243) e duas ligações do tipo éster com Glu408 e Asp260. Em pH ácido a ligação à histidina distal (His95) é liberada e o heme torna-se menos distorcido, o que facilita a ligação de íons cloreto. Uma mutação na Met243 diminui a afinidade por íons cloreto (YUE et al., 1997; KOOTER et al., 1999). O mecanismo de ação da MPO (Esq. 2) envolve a reação de sua forma férrica com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para formar um intermediário redox, o composto I (MPO I), o qual oxida os íons  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$  e outros substratos. A MPO também pode oxidar vários substratos orgânicos (principalmente fenóis, a tirosina é um dos mais importantes desses compostos no fagolisossoma, havendo formação do radical tirosil) através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários MPO I e MPO II (composto II; HAMPTON et al., 1998). A MPO-FelII reage rapidamente e de maneira reversível com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando a MPO I, que oxida haletos através de uma transferência sucessiva de 2 elétrons, em um único passo, formando seus respectivos ácidos. A MPO nativa pode ser reduzida por diferentes espécies gerando um intermediário inativo, a MPO-FelI. O composto III é formado pela ligação do ânion superóxido à MPO nativa ou pela ligação do oxigênio à MPO-FelI.



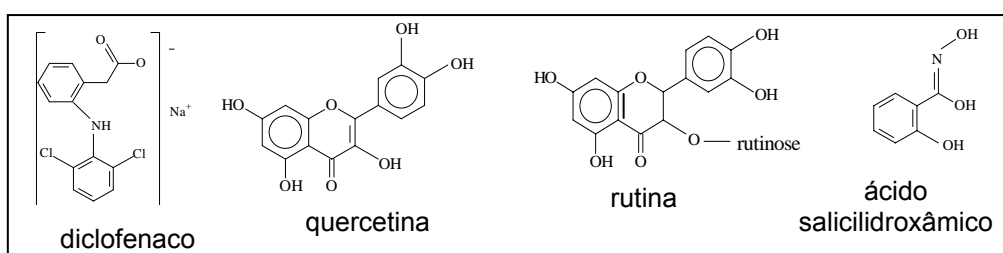
**Esquema 2: Mecanismo de ação da mieloperoxidase. A- ciclo peroxidásico clássico. B- reação do grupamento heme com o oxigênio. C- Ligação do óxido nítrico/modulação da atividade (ABU-SOUD & HAZEN, 2000).**

O NO• reage com o ferro central de hemoproteínas. Ele é capaz de se ligar às formas férrica (Fe-III) e ferrosa (Fe-II) da MPO para gerar complexos hexacoordenados estáveis (Esq. 2). Em baixas concentrações o óxido nítrico liga-se à forma ferrosa exacerbando a atividade catalítica da MPO. Em elevadas concentrações o óxido nítrico forma o complexo com a forma férrica da MPO inativando-a (Esq. 2; ABU-SOUD & HAZEN, 2000). Usando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como doador de hidrogênio, a mieloperoxidase catalisa a oxidação de doadores não específicos de elétrons, tais como o guaiacol (MERRILL, 1980), O-dianisidina (BRADLEY et al., 1982) e a tetrametilbenzidina (SCHIERWAGEN et al., 1990), cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 1.



**Figura 1: Estrutura molecular de alguns substratos da MPO**

A mieloperoxidase é inibida (Figura 2), dentre outros, pela azida (DAVIES & EDWARDS, 1989), diclofenaco (ZUURBIER et al., 1990), metimazol (PINCEMAIL et al., 1988), quercetina, (PINCEMAIL et al., 1988), rutina (PINCEMAIL et al., 1988), sulfato de rutina (PINCEMAIL et al., 1988) e ácido salicilidroxâmico (DAVIES & EDWARDS, 1989).



**Figura 2: Estrutura molecular de alguns inibidores da MPO**

## PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS ERO

As ERO são produzidos com a finalidade de combater microrganismos invasores, mas eles também provocam danos nos tecidos próximos, conhecendo-se seu envolvimento em grande número de patologias (FLOYD, 1990; HATHERILL, 1991; BABIOR, 2000). Existem evidências de que as ERO possam estar envolvidas em mais de 50 doenças (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O envelhecimento, um processo fisiológico natural, é um evento que pode estar relacionado com as ERO (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A teoria dos radicais do oxigênio, desenvolvida por Harman em 1956, propõe que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, o qual levaria a reação de oxidação lipídica, protéica, e com o DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Doenças frequentes na velhice e relacionadas com o estresse oxidativo, são a Doença de Parkinson, o Acidente Vascular Cerebral, a Doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A modificação química de proteínas é parte do processo de desenvolvimento de diferentes patologias, desde desordens como diabetes e aterosclerose até o envolvimento no processo de envelhecimento. Aldeídos são importantes agentes modificadores de proteínas que podem ser gerados no organismo por uma variedade de processos enzimáticos ou não enzimáticos. Aldeídos reativos podem ser produzidos por oxidases, desidrogenases e peroxidação lipídica. Muitos estudos demonstram que os fagócitos são capazes de promover a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) através da produção de espécies oxidantes (Esquema 3; MERTENS & HOLVOET, 2001). Na aterosclerose ocorre o influxo de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas, que ao lesarem as células vizinhas estimulam a proliferação de músculo liso subendotelial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). A LDL também é modificada pelas espécies oxidantes liberadas pelos neutrófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; JERLICH et al., 2000; WOODS & DAVIES, 2003). A enzima MPO liga-se à LDL, com implicações importantes em sua modificação oxidativa (CARR et al., 2000). Os macrófagos geralmente englobam a LDL por meio do receptor de LDL, sendo que o processo cessa quando o conteúdo de LDL no macrófago está elevado. Entretanto, a LDL oxidada não entra na célula por meio deste receptor, mas sim através do receptor *scavenger* (na verdade um grupo de receptores). A internalização de LDL oxidada, diferentemente da nativa, não é regulada pelo receptor, o que permite que quantidades mais elevadas de LDL sejam englobadas e formem-se as células espumosas como parte do processo aterogênico (BABIOR, 2000). A lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que por ser rica em ferro, catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). As complicações cardiovasculares, tais como o infarto do miocárdio, o derrame cerebral, a ulceração venosa, e a isquemia com injúria por reperfusão, parecem estar associadas com a ativação de fagócitos na microcirculação e produção de ERO (MAZZONI & SCHMIDT-SHONBERN, 1996). A injúria por reperfusão é um dano provocado após a restauração da circulação em uma área isquêmica; tal injúria é atribuída às ERO que são produzidas por neutrófilos no sítio da lesão (BABIOR, 2000). Dentre os processos pulmonares associados às ERO estão: lesão conseqüente ao tabagismo, asma, enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose e toxicidade a fármacos ou xenobióticos, tais como bleomicina, paraquat e butilidroxitolueno, (BAST et al., 1991; BOVERIS et al., 1986). Está bem documentado que após a chegada dos neutrófilos no interstício pulmonar, a ativação destas células gera o radical ânion superóxido, que lesa diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio e, como conseqüência, ocorre lesão tissular progressiva, pois o neutrófilo ativado também libera enzimas proteolíticas que degradam a elastina do arcabouço pulmonar (SEOW et al., 1994; CRYSTAL, 1991). Há fortes indícios de que a formação do edema pulmonar seja resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e superóxido pelos neutrófilos (BOVERIS, et al., 1986). Estudos têm relacionado algumas das doenças associadas ao hábito de fumar com o aumento de neutrófilos e macrófagos em tabagistas. No pulmão normal os macrófagos são células residentes enquanto os neutrófilos são praticamente inexistentes. Entretanto, em indivíduos fumantes há um grande aumento no número dessas células e com alterações morfológicas, que podem ser as responsáveis pela bronquite crônica e o enfisema (REPINE et al., 1997). A asma é uma desordem inflamatória na qual os eosinófilos são as principais células efetoras. Estas células sanguíneas acumulam-se nas vias aéreas e, como conseqüência de sua ativação, promovem danos tissulares. A concentração de peroxidase eosinofílica encontra-se aumentada nos fluidos broncoalveolares de asmáticos. Os neutrófilos também são frequentemente encontrados nas vias aéreas e, como conseqüência de sua ativação, promovem danos tissulares. Ambos, eosinófilos e neutrófilos, geram diferentes oxidantes que participam dos danos tissulares nas vias aéreas (ALDRIDGE et al., 2002).

## SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO SER HUMANO

A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de compostos conhecidos como antioxidantes (PERCIVAL, 1998), substâncias que, quando em pequenas quantidades, são capazes de retardar ou inibir processos oxidativos, como, por exemplo, a lipoperoxidação (ATOUI et al, 2005; CHUN et al, 2005). Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. As ERO, como exposto anteriormente, são geradas endogenamente como conseqüência



direta do metabolismo do O<sub>2</sub>, mas também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, o que provoca a redução incompleta de O<sub>2</sub> (ROSS & MOLDEUS, 1991). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: i) uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, e é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; ii) a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS & MOLDEUS, 1991; HEBBEL, 1986). Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo (SWANSON, 1998).

## PLANTAS MEDICINAIS E ANTIOXIDANTES

O uso de extratos de vegetais no tratamento de patologias é um hábito difundido no Brasil, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo baixo custo e pela crença de que tais produtos não promovem efeitos tóxicos. A prevenção às doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. O consumo de frutas e vegetais auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A prevenção que as frutas e os vegetais promovem contra estas patologias tem sido atribuída à ação de antioxidantes presentes nestes alimentos (YEN et al., 2001). Devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais são alvos alternativos para minimizar ou retardar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Diferentes compostos antioxidantes presentes na dieta desempenham importantes funções em retardar o desenvolvimento de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer. A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agirem como *quencher*s de oxigênio no estado singlete e triplete (CHUN et al., 2005). Compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são bons agentes antioxidantes naturais (ATOUI et al., 2005). Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores e o uso de plantas com propriedades farmacológicas também chama a atenção dos pesquisadores. As plantas medicinais desempenham um papel muito importante em saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (MOSSI et al., 2004). Extratos de frutas, cereais, e de diferentes vegetais, e seus produtos derivados, têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos (SUN & HO, 2005). A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes. Bolzani et al. (1995) identificaram ação anticâncer por parte do extrato metanólico das folhas de *Pterogyne nitens*. O fracionamento de extratos de plantas através de estudos bio-dirigidos levam ao isolamento de moléculas com atividades biológicas (BOLZANI et al., 1995). A Família Celastraceae compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical. O gênero *Maytenus* consiste de espécies lenhosas e arbustivas, tradicionalmente empregadas na medicina popular, tais como a *Maytenus ilicifolia* e a *Maytenus aquifolium*. Foram relatadas a presença de triterpenos aromáticos, agentes oxidantes, flavonóides, triterpenos e glucosídeos nestas espécies (DUARTE & DEBUR, 2005). A *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* são popularmente conhecidas no Brasil como “Espinheira Santa” devido à aparência de suas folhas e às suas propriedades terapêuticas (JORGE et al., 2004). As folhas de plantas da família Celastraceae são amplamente usadas na medicina popular no Brasil como analgésicos, anti-inflamatórios e anti-ulcerogênicos, sendo a eficácia e segurança confirmadas por estudos farmacológicos e clínicos (CORREA, 1984; SOARES et al., 2004). Souza-Formigoni et al. (1991) comprovaram a ação protetora do chá de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* contra o desenvolvimento de úlceras em animais, com ação comparada à da cimetidina. Alguns estudos com plantas da família Celastraceae caracterizaram recentemente extratos brutos destas plantas como ótima fonte de agentes antioxidantes e anti-radicais. Alguns destes estudos, realizados em nosso laboratório, estão em fase de divulgação, mas resultados prévios publicados indicam tal potencial (VELLOSA et al., 2006). Triterpenos quinonametídeos são produtos naturais de ocorrência restrita às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae. Muitos representantes desta classe são conhecidos por suas propriedades medicinais, sendo usados como agentes antimicrobianos, agentes anticâncer e agentes antimaláricos. Algumas espécies de *Salacia* (família Hippocrateaceae) são utilizadas na Índia, Sri-Lanka e China como medicamentos tradicionais da medicina popular para o tratamento de reumatismo, doenças de pele e anti-inflamatórios. Terpenos com propriedades antioxidantes são raros, mas alguns exemplos são conhecidos, como o rosmanol, e também alguns triterpenos quinonametídeos como o celastrol e a pristimerina. Carvalho et al. (2005) observaram a ação anti-radical de triterpenos quinonametídeos presentes no extrato diclorometânico da casca da raiz da *Salacia campestris*. O uso de espécies de Hippocrateaceae e Celastraceae na medicina popular deve estar relacionado ao seu conteúdo de flavonóides e triterpenos quinonametídeos (CARVALHO et al., 2005). Além da pesquisa com plantas, é importante lembrar que os fungos também são boas fontes de agentes antioxidantes e seu estudo também tem se destacado (OLIVEIRA et al, 2007)

## CONCLUSÃO

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância. Tal pesquisa deve ser divulgada e incentivada fim de fornecer alternativas terapêuticas mais eficientes e ou seguras para patologias nas quais as espécies reativas do oxigênio são fatores determinantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5425-5430, 2000.
- ALDRIDGE, R. E; CHAN, T.; VAN DALEN, C. J.; SENTHILMOHAN, R.; WINN, M.; VENGE, P.; TOWN, G. I.; KETTLER, A. J. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 33, p. 847-856, 2002.
- ANDREWS, P. C., KRINSKY, N. I. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. *Methods in Enzymology*. v. 12, p. 369-378, 1986.
- ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*. v.69, p. 4-9, 2004.
- ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R.; HALLIWELL, B. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. *Chemical and Biological Interactions*. v. 77, p. 303-314, 1991.
- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. v. 89, p. 27-36, 2005.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*. v. 109, p. 33-44, 2000.
- BAST, A.; HAENEN G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *American Journal of Medicine*. v. 91, p. 2-13, 1991.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products*. v. 58, p. 1683-1688, 1995.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIEESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annual Review of Physiology*. v. 48, p.703-719, 1986.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. v. 60, p. 618-622, 1982.
- BRIHEIM, G.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*. v. 45, p. 1-5, 1984.
- BRUNETTI, I. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC:1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas*. v. 16, p. 55-77, 1995.
- CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochemical Journal*. v. 336, p. 395-404, 1998.
- CARR, A. C.; MYZAK, M. C.; STOCKER, R.; McCALL, M. R.; FREI, B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Letters*. v. 487, p. 176-180, 2000.
- CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemthide triterpenes from *Salacia campestris*. *Chemistry & Biodiversity*. v. 2, p. 367-372, 2005.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*. v. 40, p. 809-816, 2005.

- CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura, Ed. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v. 6, p. 134-135, 1984.
- CRYSTAL, R. G. Oxidants and respiratory tract epithelial injury pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *American Journal of Medicine*. v. 91; p. 39S-44S, 1991.
- DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. I.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, acatalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigations*. v. 94, p. 437-444, 1994.
- DAVIES, B.; EDWARDS, S. W. Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochemical Journal*. v. 258, p. 801-806, 1989.
- DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia*. v. 76, p. 41-49, 2005.
- EATON, J. W. Defenses against hypochlorous acid: parrying the neutrophil's rapier thrust. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 121, p. 197-198, 1993.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 43, p. 61-68, 1997.
- FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The FASEB Journal*. v. 4, p. 2587-2597, 1990.
- FRIDOVICH, I. Oxidative stress. *Encyclopedia of life sciences*. 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 1989. In: LAPENNA, D. and CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *General Pharmacology*. v.27, p. 1145-1147, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 246, p. 501-514, 1986.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. v. 186, p.1-85, 1990.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. v. 92, p. 3007-3017, 1998.
- HARRINSON, J. E.; SCHULTZ, J. Studies on the Chlorinating activity of myeloperoxidase. *Biological Chemistry*. v. 251, p. 1371-7134, 1976.
- HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents-Actions*. v. 32, p. 351-358, 1991.
- HAZEL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residue rather than lipide peroxidation. *Biochemical Journal*. v. 302, p. 297-304, 1994.
- HAZEL, L. J.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochemical Journal*. v. 290, p. 165-172, 1993.
- HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v. 107, p. 401-404, 1986.
- JERLICH, A.; FRITZ, G.; KHARRAZI, H.; HAMMEL, M.; TSCHABUSCHNIG, S.; GLATTER, O.; SCHAUR, R. J. Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1481, p. 109-118, 2000.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activity of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 94, p. 93-100, 2004.

- KOOTER, I. M.; MOGUILLEVSKY, N.; WEVER, R. The sulphonium ion linkage in myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 274, p. 26794-26802, 1999.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *General Pharmacology*. v. 27, p. 1145-1147, 1996.
- LEFKOWITZ, D. L.; MILLS, K.; MORGAN, D.; LEFKOWITZ, S. S Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Experimental Biology and Medicine*. v. 199, p. 204-210, 1992.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and Macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* v.15, p.323-350,1997.
- MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRÜLK, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Purification of Myeloperoxidase from Equine Polymorphonuclear leucocytes. *Can. J. Vet. Res.* v.62, p. 127-132, 1998.
- MAZZONI, M. C.; SCHMID-SCHONBERN, G. W. Mechanisms and consequences of cell activation in microcirculation. *Cardiovascular Research*. v. 32, p. 709-719, 1996.
- MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal*. v. 15, p. 2073-2084, 2001.
- MERRILL, D. P. Purification of human myeloperoxidase by concanavalin A-Sepharose affinity chromatography. *Preparative Biochemistry*. v. 10, p. 133-150, 1980.
- MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I. N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO<sub>2</sub>. *Fitoterapia*. v. 75, p. 168-178, 2004.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*. v. 129, p. 113-139, 2000.
- OLIVEIRA O.M.M.F; VELLOSO J.C.R.; FERNANDES A..S.; BUFFA-FILHO W.; HAKIME-SILVA R.A.; FURLAN M.; BRUNETTI I.L. Antioxidant activity of *Agaricus blazei*. *Fitoterapia*. v. 78, p.263-264, 2007.
- PERCIVAL, M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Inside*. v. 31, p. 1-4, 1998.
- PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; THIRION, A.; DE BRUYN-DISTER, M.; GOUTIER, R. Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. Comparison with three related compounds. *Experientia*. v. 44, p. 450-453, 1988.
- PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 28, p. 1717-1725, 2000.
- REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 156, p. 341-357, 1997.
- RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 292, p. 869-873, 2002.
- ROS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 525, p. 37-44, 1978.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton: CRC Press. 1991, p.151-170.
- SAUNDERS, B. C. Peroxidases and catalases. In: EICHHORN, G.L. (Ed.), *Inorganic Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1973, p. 988-1021.
- SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIEUS, A. C.; LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *Journal of Pharmacological Methods*. v. 23, p. 179-186, 1990.
- SEOW, W. K.; THONG, Y. H.; NELSON, R. D.; MACFARLANE, G. D.; HERZBERG, M.C. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation*. v. 18, p. 119-127, 1994.

- SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 36, p. 787-790, 2004.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A.; Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 34, p. 21-27, 1991.
- SUGIYAMA, S.; OKADA, Y.; SUKHOVA, G.K.; VIRMANI, R.; HEINECKE, J.W.; LIBBY, P. Macrophage Myeloperoxidase Regulation by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Atherosclerosis and Implications in Acute Coronary Syndromes. *American Journal of Pathology*. v.158, p.879-891, 2001.
- SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*. v. 90, p. 743-749, 2005.
- SWANSON, C. Vegetables, fruits, and cancer risk: The role of phytochemicals. In: BIDLACK, W. R.; OMAYE, S. T.; MESKIN, M. S.; JAHMER, D. *Phytochemicals: a new paradigm*. Lancaster PA: Technomic Publishing, 1998, p. 1-12.
- THOMAS, E. L.; GRISHAM, M. B; JEFFERSON, M. M. Preparation and characterization of chloramines. *Methods in Enzymology*. v. 132, p. 569-585, 1986.
- VELLOSO, J.C.R.; KHALIL, N.M.; FORMENTON, V.A.F.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M., FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F.. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia*. v. 77, p.243-244, 2006
- WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; HUTCHINSON, D. C. S.; BAUM, H. Biologically significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*. v. 36, p. 3847-3850, 1987.
- WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. O. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochemical Pharmacology*. v. 37, p. 775-778, 1988.
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. *The New England Journal of Medicine*. v. 320, p. 365-376, 1989.
- WOODS, A. A.; DAVIES, J. J. Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. *The Biochemical Journal*. v. 376, p. 219-227, 2003.
- YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry*. v. 74, p. 471-478, 2001.
- YUE, K. T.; TAYLOR, K. L.; POWERS, L. S. X-Ray absorption and resonance raman spectroscopy of human myeloperoxidase at neutral and acid pH. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1338, p. 282-294, 1997.
- ZGLICZYNSKI, T. J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 235, p. 419-424, 1971.
- ZUURBIER, K. W.; BAKKENIST, A. R.; FOKKENS, R. H.; NIBBERING, N. M.; WEVER, R.; MUIJSERS, A. O. Interaction of myeloperoxidase with diclofenac. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by diclofenac and oxidation of diclofenac to dihydroxyazobenzene by myeloperoxidase. *Biochemical Pharmacology*. v. 40, p. 1801-1808, 1990.
- ZUURBIER, K. W; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. *European Journal of Biochemistry*. v. 205, p. 737-742, 1992.