



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DAS PROANTOCIANIDINAS**

Trabalho submetido por  
**Joana Marques Peras de Almeida**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2014**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DE PROANTOCIANIDINAS**

Trabalho submetido por  
**Joana Marques Peras de Almeida**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Alexandra Bernardo**

**Outubro de 2014**

*Dedicatória*

*À mãe Lidia!*

Que me ensinou:

*“Não tenhais medo da vastidão do Universo,  
porque nela encontrareis o vosso lugar”*

*Thomas Blake*



## ***Agradecimentos***

Gostaria de mostrar o meu reconhecimento e gratidão à minha orientadora, ***Professora Doutora Alexandra Bernardo***, por todas as críticas construtivas que me permitiram chegar até aqui. Muito obrigada pelo apoio, orientação, colaboração e disponibilidade ao longo destes últimos meses.

Um agradecimento especial á minha ***família e amigos*** por toda a paciência, incentivo e companheirismo prestado ao longo destes 5 anos.

Ao ***Ruben Madeira*** por sempre me ter encorajado e acompanhado ao longo deste percurso.



## Resumo

**Introdução:** As proantocianidinas também designadas por taninos condensados, são compostos fenólicos que pertencem à família dos flavonóides e estão amplamente distribuídos pelas frutas, sementes e vegetais. A biodisponibilidade das proantocianidinas é determinada pela estrutura química e as suas propriedades biológicas estão associadas à recaptação de radicais livres.

**Metodologia:** Esta revisão foi realizada com base na pesquisa de informação credível em várias bases de dados (Pubmed, o Cochrane e a B-on) e obteve-se como resultado final 83 referências. Relativamente aos filtros utilizados excluíram-se as referências bibliográficas com mais de 10 anos.

**Resultados:** A revisão bibliográfica sugere que a presença de proantocianidinas nos alimentos está relacionada com as suas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-microbianas e anti-cancerígenas. Vários estudos reconhecem que as proantocianidinas têm propriedades interessantes face à obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, cancro e infeções urinárias.

**Discussão e perspectivas futuras:** A ingestão de alimentos ricos em proantocianidinas pode exercer uma ação coadjuvante numa abordagem integrada com objectivo preventivo ou terapêutico em diversas patologias. Ao longo do tempo têm sido feitos vários estudos nesta área no sentido de aprofundar os conhecimentos relativos às propriedades biológicas destes compostos. As investigações realizadas recentemente têm revelado que a administração das proantocianidinas em concomitância com outras terapêuticas poderá trazer enormes vantagens para a saúde.

**Palavras Chave introdução:** estrutura química de proantocianidinas

**Palavras Chave resultados:** capacidade anti-oxidante das proantocianidinas



## **Abstract**

**Introduction:** Proanthocyanidins, also called condensed tannins, are phenolic compounds belonging to the flavonoid family and are widely distributed among fruits, seeds and vegetables. The bioavailability of proanthocyanidins is determined by their chemical structure and biological properties and is mainly attributed to the ability to uptake free radicals as by its antioxidant activity.

**Methods:** We conducted an initial literature search from which we obtained 125 references and subsequently held a secondary research in order to select the most thorough way the articles obtained, resulting in a total of 83 articles. The databases consulted for this literature search were: Pubmed, Cochrane and the B-on. Concerning filters used were excluded bibliographic references with more than 10 years.

**Results:** Proanthocyanidins have anti-oxidant, anti-inflammatory anti-microbial anti-cancerigeneous properties, and several studies recognize that proanthocyanidins have interesting properties regarding control of obesity, diabetes, cardiovascular disease, rheumatoid arthritis, cancer and urinary infections.

**Discussion and future prospects:** The consumption of proanthocyanidins brings numerous beneficial health effects. Over time many studies have been done in this area in order to enhance the knowledge about the biological properties of these compounds. The investigations carried out recently have shown that administration of proanthocyanidins concomitantly with other therapies can bring huge benefits to health.

**Key words Introduction:** chemical structure of proanthocyanidins

**Key words results:** anti-oxidant capacity of proanthocyanidins,



## Índice Geral

Dedicatória.....	Pág. 3
Agradecimentos.....	Pág. 5
Resumo.....	Pág. 7
Abstract.....	Pág. 9
Índice Geral.....	Pág. 11
Índice de Figuras.....	Pág. 13
Índice de Tabelas.....	Pág. 15
Índice de Abreviaturas.....	Pág. 17

### Capítulo 1

1.1. Caracterização das Proantocianidinas.....	Pág. 21
1.2. Propriedades Físico-Químicas e Biológicas.....	Pág. 27
1.3. Justificação do Tema da Tese.....	Pág. 29

### Capítulo 2

Metodologia da Pesquisa Bibliográfica.....	Pág. 31
--	---------

### Capítulo 3

3.1. Atividade Anti-inflamatória, Anti-oxidante e Antisséptica das PAs	
3.1.1. Atividade Anti-oxidante.....	Pág. 33
3.1.2. Atividade Anti-inflamatória.....	Pág. 37
3.1.3. Atividade Antisséptica.....	Pág. 40
3.2. Papel das Proantocianidinas na Doença	
3.2.1. Obesidade.....	Pág. 42
3.2.2. Diabetes.....	Pág. 46
3.2.3. Doença Cardiovascular.....	Pág. 47
3.2.4. Artrite Reumatóide.....	Pág. 52
3.2.5. Cancro.....	Pág. 54
3.2.6. Infecção Urinária.....	Pág. 61

### Capítulo 4

Conclusão e Perspetiva Futura.....	Pág. 63
Bibliografia.....	Pág. 65
Anexos	



## Índice de Figuras

**Figura 1** - Estrutura geral comum de flavonóides presentes em produtos alimentares derivados de plantas

**Figura 2** - Estrutura comum das proantocianidinas

**Figura 3** - Formação da ligação interflavanol de procianidinas

**Figura 4** - Estrutura química de oligómeros de procianidinas (B1 a B4) tipo B

**Figura 5** - Estrutura química de proantocianidinas do tipo A

**Figura 6** - Configuração das proantocianidinas

**Figura 7** - Fontes e respostas celulares associadas às espécies reativas (ER) de oxigénio (ERO), de nitrogénio (ERN), derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCL), de carbono (ERC) e metais de transição [ $M^{n+}$ ].

**Figura 8** - Esquema da ação dos flavonóides na via do ácido araquidónico da membrana fosfolípídica

**Figura 9** - Obesidade Vs Regulação da restrição calórica

**Figura 10** - Mecanismos de inflamação induzidos pelo processo de resistência à insulina

**Figura 11** - Locais de ação das catequinas na aterosclerose

**Figura 12** - Efeito das procianidinas nos níveis de cGMP

**Figura 13** - Diagrama dos efeitos do stress oxidativo na doença cardiovascular

**Figura 14** - Mecanismo de inflamação associado á artrite reumatoide e osteoporose e respetiva ação das EGCG e cianidinas

**Figura 15** - Representação esquemática dos múltiplos estágios da carcinogénese da pele, induzida pela radiação UV

**Figura 16** - Diagrama dos mecanismos quimiprotetores dos polifenóis na fotocarcinogénese

**Figura 17** - Atividade anti-tumoral dos flavonóides

**Figura 18** - Mecanismos moleculares das proantocianidinas na prevenção do cancro

## **Índice de Tabelas**

**Tabela 1** - Quadro resumo da Atividade Anti-inflamatória das proantocianidinas

**Tabela 2** - Quadro resumo da influência dos flavonóides nas CVD

**Tabela 3** - Mecanismos de ação de catequinas e epicatequinas na foto-proteção da pele

**Tabela 4** - Quadro resumo da atividade das proantocianidinas

**Tabela 5** - Quadro resumo do mecanismo de ação das proantocianidinas nas doenças



## **Lista de Abreviaturas**

- AGE** – Glicosilação avançada
- AMPc** – Adesina monofosfato cíclico
- AP-1** – Proteínas de sinalização
- ATM** – Macrófagos tecidulares presentes no tecido adiposo
- ATP** – Adenosina trifosfato
- ASK<sub>1</sub>** – Regulador do sinal de apoptose
- AVC** – Acidente vascular cerebral
- Akt** – Via associada ao processo inflamatório
- BAD** – Proteína mediadora da apoptose
- BAX** - Proteína mediadora da apoptose
- BCL<sub>2</sub>** - Proteína inibidora da apoptose
- BCL<sub>x</sub>** - Proteína inibidora da apoptose
- CDK** – Proteína (ciclina dependentes da Quinase)
- CDK<sub>2</sub>** – Proteína (ciclina dependentes da Quinase 2)
- CDK<sub>4</sub>** – Proteína (ciclina dependentes da Quinase 4)
- CDK<sub>6</sub>** – Proteína (ciclina dependentes da Quinase 6)
- cGMP** – Monofosfato de guanosina cíclica
- COX** – Ciclooxygenase
- COX<sub>2</sub>** – Ciclooxygenase<sub>2</sub>
- C0Q** – Coenzima Q
- CPACs** – Proantocianidinas do arado
- CR** – Restrição calórica
- CVD** – Doenças cardiovasculares
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- EAM** – Enfarte agudo do miocárdio
- EGR<sub>1</sub>** – Via associada á síntese de prostaglandinas
- EGCG** – Epigallocatequinas presentes na semente da uva
- eNOS** – estimulação de óxido nítrico sintetase
- EPEC** – Infecções causadas por *Escherichia coli*
- ERK** – Via de sinalização
- ERO** – Espécies reativas de oxigénio

**ERN** – Espécies reativas de nitrogénio  
**ERS** - Espécies reativas de enxofre  
**ERCL** - Espécies reativas de cloro  
**ERC** - Espécies reativas de carbono  
**FAT** – Sintetase de ácidos gordos  
**GHSR** – Via de sinalização da glutatona  
**GMPC** - Monofosfato de guanosina cíclico  
**GSH** – Glutatona  
**GSPE** – Proantocianidinas presentes nas sementes de uva  
**GP<sub>x</sub>** – Glutatona peroxidase  
**HDAC** – Inibição da histona desacetilase  
**ICAM<sub>1</sub>** – Molécula de adesão intracelular  
**IFN-8** – Interferão 8  
**Ig<sub>2</sub>A** – Imunoglobulina específica para o colagénio tipo 2  
**IL<sub>1</sub>B** – Interleucina 1 B  
**IL<sub>6</sub>** – Interleucina 6  
**IL<sub>8</sub>** – Interleucina 8  
**IL<sub>10</sub>** – Interleucina 10  
**IL<sub>12</sub>** – Interleucina 12  
**IL<sub>17</sub>** – Interleucina 17  
**INOS** – Inibidores de sintetase de óxido nítrico  
**JNK** – Via de sinalização  
**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade  
**MAPK** – Proteínas quinase ativadas por mitogénio  
**MCP<sub>1</sub>** – Proteína de baixo peso molecular pertencente á família das quimiocinas  
**MMPs** – Metaloproteinases  
**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NF-κB** – Fator de transcrição pró-inflamatório  
**NO** – Óxido nítrico  
**NOS** – Óxido nítrico sintetase  
**Nrf2** – Fator nuclear redox  
**OH** – Hidróxido  
**PAs** – Proantocianidinas  
**P<sub>38</sub>** – Proteína

**P<sub>53</sub>** – Proteína  
**PI<sub>3</sub>K** – Via de sinalização da inflamação  
**PK** – Proteína quinase  
**PKc** – Proteína quinase C  
**PG** – Prostaglandinas  
**RA** – Artrite reumatóide  
**RANKL** – Ativação do receptor nuclear do fator ligando Kappa-B  
**RL** – Radicais livres  
**SFA** – Ácidos gordos livres  
**SIRT<sub>1</sub>** – Via de sinalização  
**SOD** – Superóxido dismutase  
**TGF-B<sub>1</sub>** – Fator de crescimento do desenvolvimento vascular  
**TNF- $\alpha$**  – Proteína pró-inflamatória  
**TRAP** – Resistência à fosfatase  
**U.V** – Ultra violeta  
**VCAM<sub>1</sub>** – Molécula de adesão celular vascular



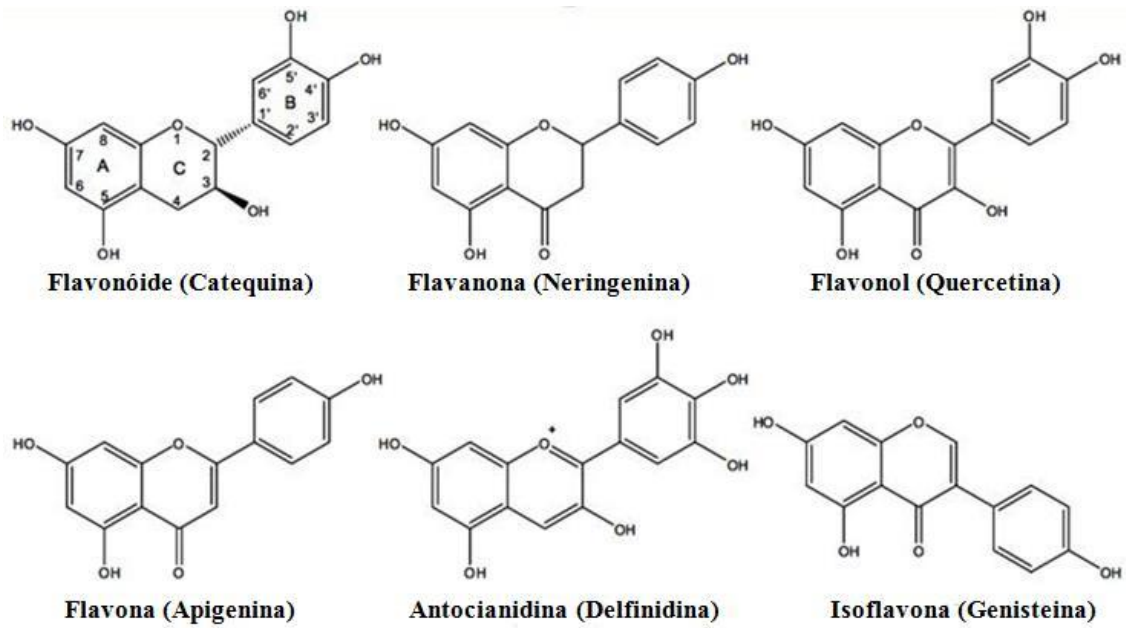
## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1 Caracterização geral das proantocianidinas

As proantocianidinas (PAs) estão presentes em frutas e produtos derivados (como sumos ou compotas), bem como no chá, cacau, cereais, bem como nas cascas, sementes de frutas e vegetais. (S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, 2010) As proantocianidinas mais consumidas, estão presentes em alimentos como o arando e a amora, (T. C. Wallace & Giusti, 2010) assim como no chá e no vinho. (Šeruga, Novak, & Jakobek, 2011) Durante o armazenamento e processamento das frutas e vegetais, as PAs sofrem algumas transformações oxidativas, catalisadas por enzimas (polifenoloxidase) ou por iões metálicos, que levam à formação de novos compostos com elevado peso molecular e número de anéis fenólicos por massa, similar à das PAs, também designados por taninos condensados. A formação destes produtos resulta do esmagamento dos tecidos de plantas, da preparação de purés de fruta, bem como de processos de fermentação. Os compartimentos das plantas são destruídos e os polifenóis presentes no vacúolo misturam-se com as oxidases do citoplasma, que se encontram inicialmente separados. (Pacheco-Palencia, Mertens-Talcott, & Talcott, 2008)

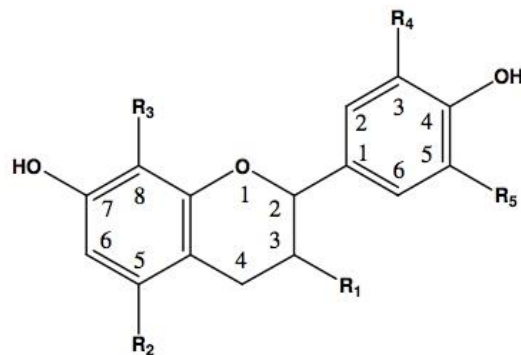
O interesse em aprofundar os conhecimentos relativos às proantocianidinas, têm vindo a crescer ao longo do tempo, devido sobretudo à atividade anti-oxidante que estes compostos têm demonstrado possuir. (Kylli et al., 2011)

As PAs são compostos fitoquímicos, definidos como componentes bioativos presentes nas plantas, frutas e vegetais (Huang, Cai, & Zhang, 2010) que apesar de serem considerados micronutrientes não essenciais, apresentam um vasto leque de benefícios para a saúde. (Scalbert et al., 2011) A classe de polifenóis, inclui os flavonóides (Bolling, McKay, & Blumberg, 2010), intitulados como um grupo de metabolitos secundários presentes nos organismos vegetais. (Wang et al., 2013) Estes são caracterizados por 15 carbonos com dois ou mais anéis aromáticos unidos por uma ligação de três carbonos. De acordo com a modificação do anel central, estes podem ser divididos em classes estruturais diferentes: flavonóis, flavonas, flavan-3-ol, flavanonas, isoflavanonas e antocianidinas. (Beecher, 2003) (Figura 1)



**Fig.1:** Estrutura geral de flavonóides presentes em produtos alimentares derivados de plantas. Adaptado de (S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, 2010)

Como mencionado anteriormente, dentro do grupo dos flavonóides existe uma vasta panóplia de subclasses, onde se destacam as proantocianidinas. (Figura 2)

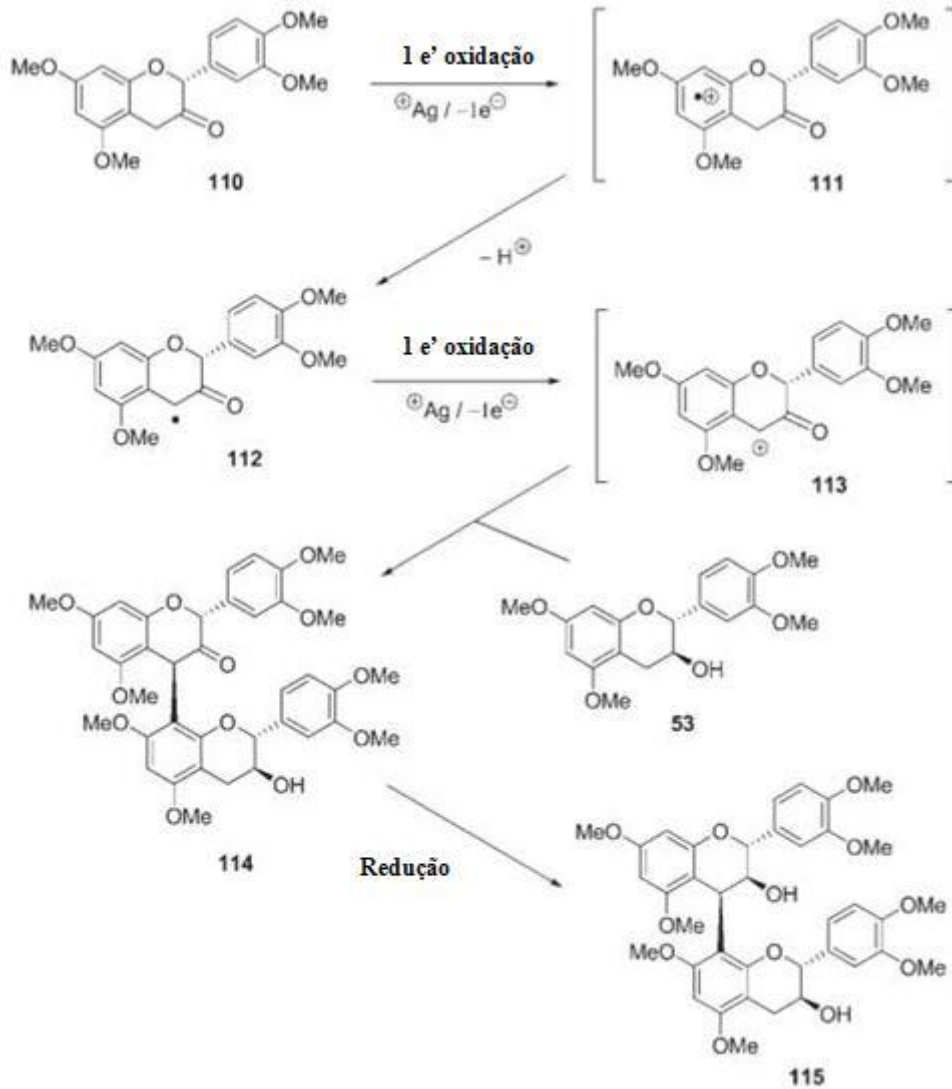


**Fig.2:** Estrutura comum das proantocianidinas. Retirado de (S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, 2010)

A flavan-3-ol é estruturalmente a subclasse mais complexa de flavonóides, uma vez que integra monómeros designados como catequinas, isómeros intitulados como epicatequinas e oligómeros e/ou polímeros conhecidos por proantocianidinas. Em suma, as PAs (proantocianidinas), também designadas por taninos condensados são oligómeros ou polímeros de flavan-3-ol. (Wang et al., 2013)

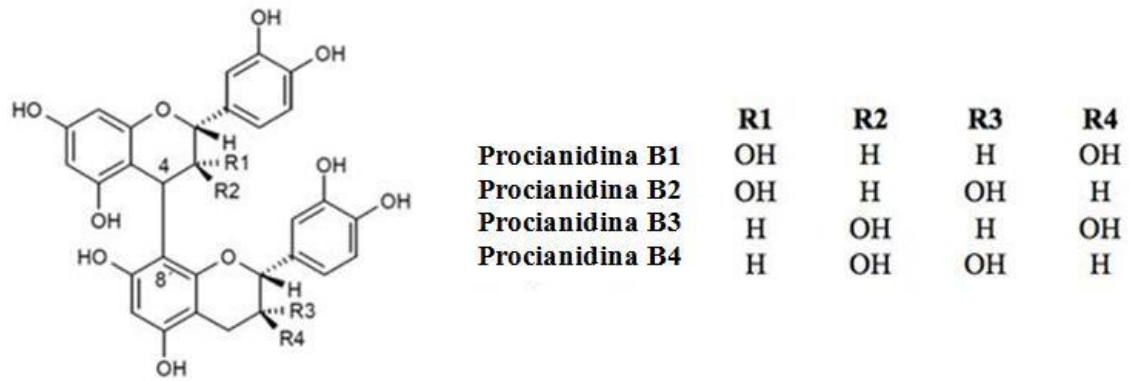
A estrutura das proantocianidinas varia de acordo com a hidroxilação do anel A e B, com a estereoquímica do C2, C3 e C4 do anel central e depende das ligações entre unidades de flavan-3-ol. (Monagas, Quintanilla-López, Gómez-Cordovés, Bartolomé, & Lebrón-Aguilar, 2010) Relativamente à natureza da ligação entre unidades de flavan-3-ol podemos dizer que esta ligação pode ocorrer em diferentes locais, bem como, pode apresentar várias formas estereoquímicas. (Figura 3)

As unidades de flavan-3-ol possuem uma cadeia com três carbonos saturados e um grupo hidroxilo na posição C3. Nos alimentos, estes compostos nunca se apresentam na sua forma glicosilada. (M. L. Mateos-Martín, E. Fuguet, C. Quero & Torres, 2012) As unidades monoméricas mais comuns das PAs presentes nos frutos e vegetais são afzelequina, catequina, galocatequina e os seus diasteómeros : afzelequina, epicatequina e epigalocatequina, os quais possuem um anel de floroglucinol do tipo A. Algumas destas unidades podem ser esterificadas com moléculas como a glucose ou ácido gálico. As PAs constituídas apenas por unidades de epicatequinas são designadas por procianidinas, sendo as principais PAs presentes nas plantas. As propelargonidinas e prodelfinidinas são também identificadas como PAs, contém afzelequina e epigalocatequina, respetivamente e aparecem usualmente misturadas com procianidinas.



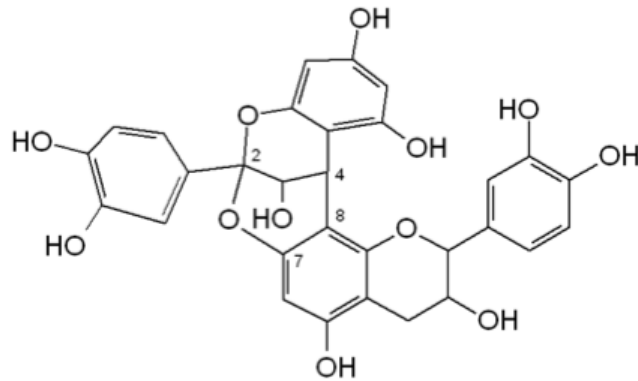
**Fig. 3:** Formação da ligação interflavanol de procianidinas. Adaptado de (Ferreira & Coleman, 2011)

As procianidinas do tipo B são constituída por monómeros interligados entre si, através de uma ligação entre a posição C4 da unidade superior e a posição C6 ou C8 da unidade terminal. (Figura 4) Os isómeros C4-C8 são mais abundantes que os C4-C6 e adotam frequentemente a forma estereoquímica 3,4 – trans. (Tarascou et al., 2011)



**Fig.4:** Estrutura química de oligómeros de procianidinas (B1 a B4) tipo B. Adaptado de (S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, 2010)

As procianidinas do tipo A, (Figura 5) são constituídas por monómeros de flavan-3-ol e estabelecem uma ligação do tipo éter, na posição C2 da unidade superior e o grupo hidroxilo na posição C5 ou C7 da unidade inferior. (Tarascou et al., 2011)



**Fig.5:** Estrutura química de proantocianidinas do tipo A. Retirado de (M. L. Mateos-Martín, E. Fuguet, C. Quero & Torres, 2012)

A combinação das variadas ligações resulta na diversidade da estrutura dimensional deste grupo de moléculas. (Neto, 2007) (Figura 6)

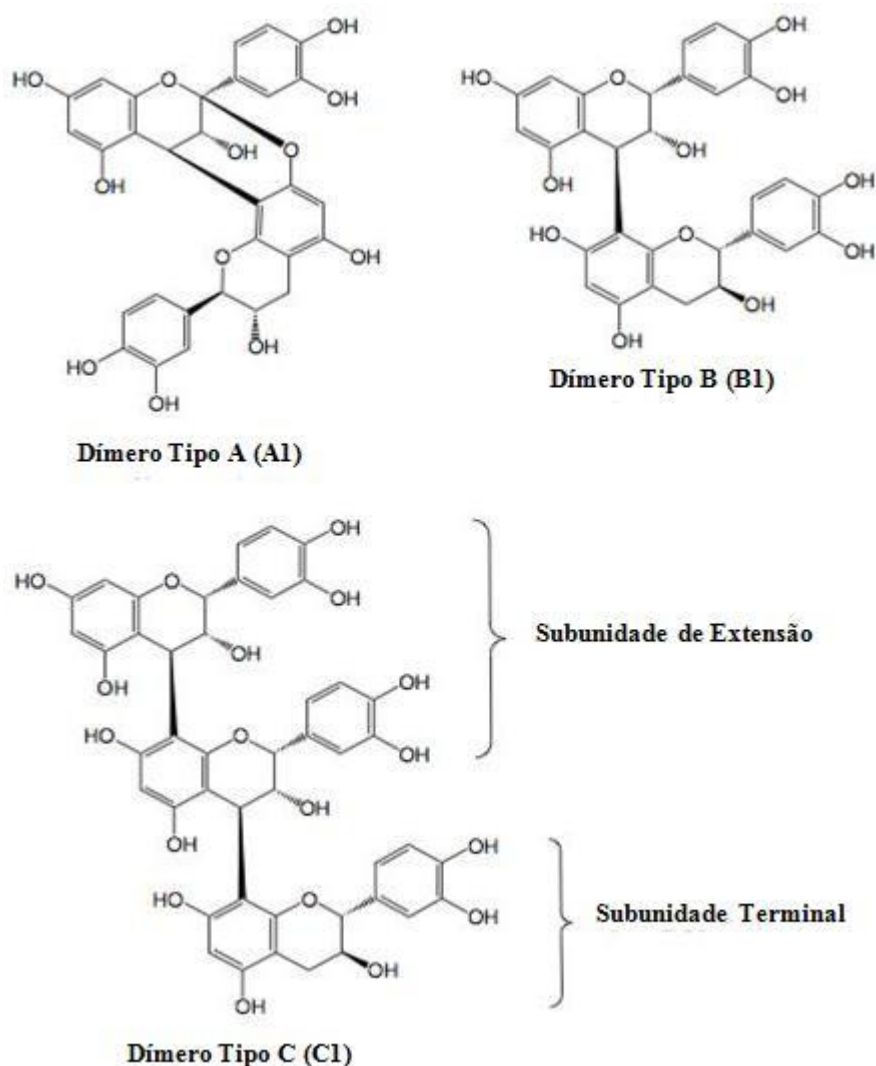


Fig.6: Configuração das proantocianidinas. Adaptado de (T. Wallace, 2010)

A biodisponibilidade das PAs é determinada pela estrutura química destes compostos, que devido ao seu elevado grau de polimerização acabam por ser menos biodisponíveis. (Jaganath & Crozier, 2010)

As moléculas mais pequenas, como os monómeros de catequinas, podem ser facilmente absorvidos através da barreira intestinal, enquanto que as moléculas de elevado peso molecular como as proantocianidinas são fracamente absorvidas. Os polifenóis depois de absorvidos são conjugados com grupos como o glucorónido ou

sulfato de metilo na mucosa do intestino e tecidos internos. Os polifenóis não conjugados estão praticamente ausentes no plasma. (J. A. Nichols, 2010)

Durante a digestão no intestino, as moléculas polifenólicas de maiores dimensões são convertidas em moléculas mais pequenas ou metabolitos capazes de desenvolver efeitos benéficos no corpo. (J. A. Nichols, 2010)

Após ingestão, as PAs são detetadas no plasma do organismo humano, normalmente sob a forma conjugada, no entanto, também podem encontrar –se sob a forma sulfatada, glucoronada ou mesmo sob metabolitos metilados. (Aron and Kennedy 2008). O metabolismo das PAs ocorre na microflora intestinal, originando pequenos compostos biativos. (J. A. Nichols, 2010) Os compostos polimerizados são menos biodisponíveis que as unidades monoméricas. (Auger, Mullen, Hara, & Crozier, 2008)

A penetração tópica de polifenóis na pele é limitada, no entanto os resultados são satisfatórios quando as formulações tópicas incluem lípidos solúveis e solventes orgânicos. (J. A. Nichols, 2010)

## 1.2. Propriedades físico-químicas e biológicas

Algumas características organolépticas, presentes nos frutos e vegetais, como a cor, adstringência, amargura e aroma podem estar associadas às PAs, e são responsáveis pelo caráter ativo na qualidade nutricional e sensorial de alguns alimentos. (Aron and Kennedy 2008)

A cor das plantas está associada à presença de compostos com coloração castanha resultantes da oxidação enzimática de compostos fenólicos. A adstringência resulta da interação dos taninos com as proteínas salivares. A importância dos flavonóides no aroma da fruta é baixa, no entanto, pode estar associada a reações químicas ou enzimáticas de fenóis aromáticos por parte de precursores glicosilados durante o processo de maturação.

Os taninos são componentes não cristalizáveis. Estes são solúveis em meio alcalino diluído, álcool, glicerol e acetona, e apenas moderadamente solúveis em outros solventes orgânicos. Determinadas soluções precipitam metais pesados, alcalóides, glicosídeos e proteínas. (Dewick, 2009)

O teor de proantocianidinas presente na fruta e vegetais está associado a alguns fatores como, a genética, o estado de desenvolvimento e maturação da planta, fatores ambientais e condições de cultura. Todos estes parâmetros influenciam o metabolismo das proantocianidinas, bem como a sua interação celular, diferenciação dos tecidos, controlo da expressão genética e regulação da atividade enzimática. Hipoteticamente, as células respondem aos fitoquímicos através de interações diretas com os recetores ou com as enzimas, que envolvem o sinal de transdução ou a modificação da expressão genética, que pode resultar em alterações do estado redox das células. Além de que, os flavonóides interferem em processos moleculares, especialmente como moduladores intracelulares no seguimento da cascata, que é fundamental para a capacidade vital da célula.

As propriedades biológicas dos flavonóides são atribuídas principalmente à capacidade de recaptção de radicais livres bem como à sua atividade antioxidante. (Šeruga et al., 2011) O conhecimento da composição fitoquímica das proantocianidinas poliméricas é importante para perceber qual a relação entre a estrutura química e a capacidade AOX. (Qaadan, Nahrstedt, Schmidt, & Mansoor, 2010) O grupo hidroxilo presente na estrutura dos compostos fenólicos funciona como dador de hidrogénios contribuindo de forma eficaz para a captação de radicais livres efetuada pelas PAs. (Nakamura et al., 2013) A hidroxilação na posição 3 do anel C, aumenta o número de grupos hidroxilo no anel B e influencia a saturação da ligação 2-3 no anel C, favorecendo a sua atividade de captação, através destas reações químicas. (Woo & Kim, 2013)

### 1.3. Justificação do tema de tese

O aumento da incidência de doenças crónicas, incluindo o cancro e doenças cardiovasculares, tem vindo a consciencializar a população da importância dos alimentos que ingerimos. Vários estudos efetuados comprovam que os indivíduos que ingerem quantidades consideráveis de frutas e vegetais correm menor risco de incidência de determinadas doenças crónicas, uma vez que as frutas e vegetais são consideradas fontes ricas em micronutrientes, fibras e fitoquímicos que individualmente ou em combinação trazem enormes vantagens benéficas para a saúde. Estes alimentos, considerados por muitos “alimentos funcionais” apresentam propriedades biológicas

devidamente justificadas que comprovam a sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-viral, anti-carcinogénica, anti-bacteriana e cardioprotectora. (Šeruga et al., 2011)

As propriedades antioxidantes associadas às proantocianidinas confere-lhes potencial interesse do ponto de vista da sua aplicação terapêutica pelo que esta tese tem como objectivo tornar visível o estado da arte relativamente a esta temática, uma vez que a capacidade AOX das proantocianidinas pode trazer inúmeros efeitos benéficos para a saúde. A idade está associada a um declínio gradual das funções fisiológicas e cognitivas. Este fator, aumenta o risco de aparecimento de numerosas doenças, como a diabetes, o cancro, doenças degenerativas incluindo a doença do Alzheimer, huntington e Parkinson. O maior desafio para o sistema de saúde, é encorajar a população a ter hábitos de vida saudáveis, promovendo o consumo de fitoquímicos como as proantocianidinas. Ao longo das décadas, tem sido feitos progressos significativos quanto á elucidação dos mecanismos moleculares de envelhecimento e conclui-se que o principal mecanismo associado a este processo, prende-se com a hipótese do aumento de radicais livres, tais como espécies reativas de oxigénio produzidas a partir do metabolismo associado ao dano oxidativo de macromoléculas, proteínas, DNA e lípidos. O aumento de danos oxidativos com a idade provoca o envelhecimento biológico, que pode ser atenuado com o consumo de nutracêuticos capazes de prolongar a longevidade e reduzir o stress oxidativo. Muitos investigadores têm mostrado esforço em conseguir determinar quais os compostos fitoquímicos capazes de prolongar a qualidade de vida e mimetizar os danos oxidativos associados aos mecanismos naturais a que a idade nos sujeita e os resultados revelam que estes compostos são capazes de captar radicais livres minimizando o risco oxidativo, que aparenta ser mais suscetível com o envelhecimento. Posto isto, torna-se interessante aprofundar os conhecimentos nesta área, já que as proantocianidinas são flavonóides com extensa presença em variados alimentos, com capacidade AOX comprovada e reduzem o stress oxidativo.



## Capítulo 2 - Metodologia da pesquisa bibliográfica

Esta tese teve como base o modelo de revisão bibliográfica sistematizado. A revisão sistemática consiste numa exposição precisa de conteúdos que respondem a questões previamente elaboradas e deve assentar nas seguintes etapas: elaboração de uma questão científica; definição de critérios de inclusão e exclusão; planificação da estratégia de pesquisa; análise e seleção do material bibliográfico segundo os critérios previamente definidos, síntese da informação obtida e respetiva interpretação. (Marques, Marques, Silveira, & Mata, 2013)

Questão: Quais as atividades das proantocianidinas com potencial interesse na saúde?

Teve-se como objectivo a recolha de informação recente sobre o tema pelo que a janela temporal foi restringida aos últimos 10 anos. No entanto, verificou-se que determinados mecanismos, que têm vindo a ser estudados ao longo do tempo, permaneceram inalteráveis em comparação com a informação publicada recentemente, pelo que para a explicação de determinadas temáticas, optou-se por utilizar referências bibliográficas mais remotas, visto estes conteúdo estarem mais completos nestas referências bibliográficas mais antigas.

O conteúdo foi escrito com base na informação recolhida, após ter sido feita uma pesquisa com o objetivo de conhecer o trabalho desenvolvido por outros pesquisadores. Realizou-se uma pesquisa primária no Pubmed, Cochrane e B-on. onde se obteve aproximadamente 125 referências bibliográficas. De forma a seleccionar os artigos relevantes para o tema, utilizou-se a partícula “OR” entre as palavras chave, o que resultou num total de 91 referências. Por fim, para tornar a pesquisa mais completa foi realizada uma pesquisa secundária através da análise das bibliografias dos artigos seleccionados e obtiveram-se no final 83 artigos.

Relativamente à introdução, as palavras-chave inseridas no motor de pesquisa foram as seguintes: *chemical structure of proanthocyanidins, physicochemical properties of proanthocyanidins, metabolism of proanthocyanidins, bioavailabilities of*

*flavan-3-ol*. Desta forma foi possível selecionar os artigos relevantes para a edição do capítulo da introdução que incide na caracterização geral destes compostos. Através destas palavras-chave foram obtidas 21 referências bibliográficas.

Relativamente à pesquisa bibliográfica de suporte aos resultados, foram colocadas no motor de busca as seguintes palavras-passe: *anti-oxidant capacity of proanthocyanidins, effect of proanthocyanidins in cancer cells, proanthocyanidins in the prevention of urinary tract infection, modulating inflammatory mechanisms for proanthocyanidins, Antimicrobial activity of proanthocyanidins e proanthocyanidins reduce oxidative stress*. Como resultado da pesquisa foram obtidas 62 referências bibliográficas.

Quanto ao tipo de redação, pretendeu-se escrever de forma clara, objetiva e precisa. Procurou-se encontrar pontos de convergência e divergência entre os autores e editar o tema com base na ideia central, expondo os conteúdos de forma direta e sem repetições.

A fim de gerir as referências bibliográficas de forma eficaz, foi utilizado o programa gerenciador de referências: o Mendeley. Esta ferramenta foi de extrema utilidade, uma vez que permitiu criar uma base de dados e inserir as citações e referências diretamente no texto à medida que este ia sendo editado.

As bases de dados consultadas para esta pesquisa bibliográfica foram: o Pubmed, o Cochrane e a B-on.

## Capítulo 3 – Resultados e Discussão

### 1. Atividade Anti-Oxidante, Anti-Inflamatória e Antisséptica das Proantocianidinas

#### 1.1 Atividade Anti-Oxidante das PAs

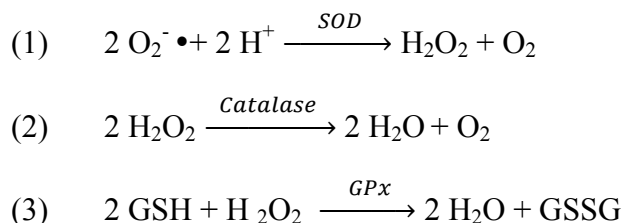
Os radicais livres (RL), podem ser definidos como moléculas ou fragmentos de moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Esta característica confere-lhes um grau de reatividade, prejudicial para os sistemas biológicos sendo responsável por causar danos oxidativos no organismo. Os RL, também designados por espécies reativas (ER) incluem as ERO (espécies reativas de oxigénio) e as ERN (espécies reativas de nitrogénio). (S.Machado R. Ribeiro, J. Queiroz, 2005)

A produção de ERO/ERN é um mecanismo que integra o metabolismo humano. Estas espécies têm uma importante função biológica, desempenhando um papel crucial no controlo da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, bem como na fagocitose de microrganismos patogénicos. A produção destes compostos ocorre durante a fagocitose e no combate do organismo face a um agente agressor. Quando ocorre um excesso de produção de ERO/ERN o organismo humano possui um eficiente sistema anti-oxidante capaz de controlar e reestabelecer o equilíbrio. O stress oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e anti-oxidante, com prevalência dominante de espécies oxidantes que causam danos celulares. O dano celular resulta da agressão de ERO/ERN sobre as macromoléculas como os açúcares, proteínas, lípidos e DNA. (Afanas'ev, 2011)

As ERO/ERN compreendem radicais superóxido ( $\bullet\text{O}_2$ ), singuletos de oxigénio ( $\text{O}_2$ ), hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) entre outros. (Figura 7) Estes compostos podem ser produzidos por fatores endógenos (mitocôndria, produtos resultantes do metabolismo do citocromo p450, peroxissomas ou células inflamatórias ativadas) ou por fatores exógenos, como por exemplo poluentes atmosféricos, irradiação emitida pela luz UV, raios-X/ $\gamma$  e reações catalisadas por metais. (Prasad et al., 2009)

A mitocôndria corresponde ao organelo celular que produz maior quantidade de ERO e contém enzimas anti-oxidantes como a monoxigenase microsossomal, a glutathione S-transferase, a succinoxidase, a NADPH oxidase bem como a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $\text{O}^\bullet$ ) em peróxido de hidrogénio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigénio (O<sub>2</sub>) (equação 1), a catalase (CAT) que atua na decomposição de (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a (O<sub>2</sub>) e (H<sub>2</sub>O) (equação 2) e a glutathiona peroxidase (GPx) que atua nos peróxidos em geral e utiliza a glutathiona (GSH) como co-fator (equação 3).

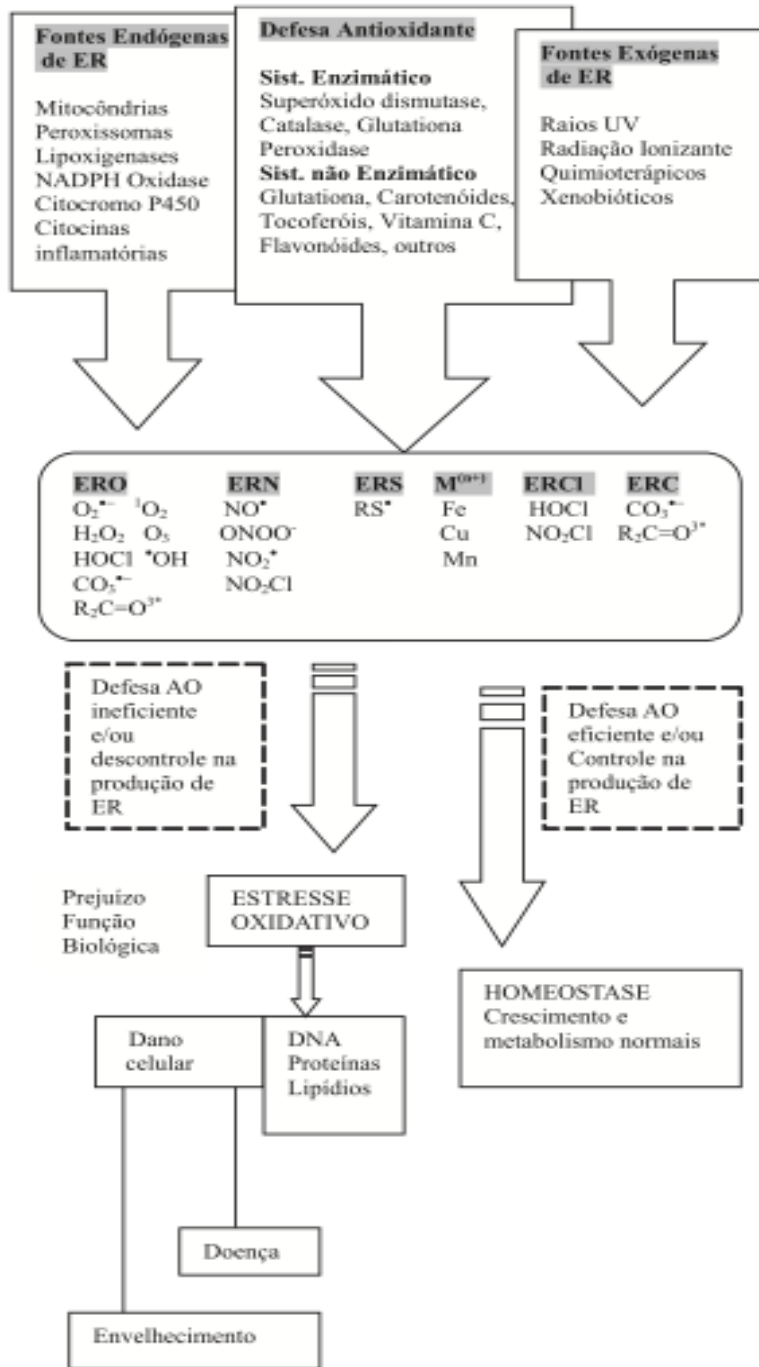


Estas enzimas anti-oxidantes estão presentes tanto no lado interior da membrana celular, como no exterior, com o objetivo de minimizar o stress oxidativo que se manifesta nesta estrutura celular. O sistema anti-oxidante não enzimático é formado por muitos compostos com principal destaque para a glutathiona (GSH) que corresponde á principal substância AOX intracelular. (Afanas'ev, 2011)

As proantocianidinas apresentam propriedades anti-oxidantes determinadas por 5 fatores: reatividade com o agente doador de hidrogénio e eletrões, estabilidade do radical flavonóide formado, reatividade face a outros AOX, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. (Prasad et al., 2009)

A atividade de captação está diretamente associada ao potencial de oxidação do radical flavonóide formado assim como o potencial redox da espécie a ser eliminada. Quanto menor o potencial de oxidação dos flavonóides, maior será a sua capacidade de atrair espécies reativas. Os flavonóides cujo potencial de oxidação é menor que o do Fe<sup>+2</sup> e o Cu<sup>+</sup> torna-se capaz de reduzir estes metais que são potencialmente pro-oxidantes, uma vez que participam nas reações de Fenton responsáveis pela produção de RL. (Prasad et al., 2009)

Relativamente à estrutura das PAs verificou-se que quanto maior o número de grupos hidroxilo presentes no anel B das proantocianidinas maior a sua atividade doadora de hidrogénios e eletrões, logo a metilação dos grupos hidroxilo reduz a capacidade anti-oxidante das PAs. (Prasad et al., 2009) Posto isto verifica-se que o aumento do grau de polimerização aumenta a eficácia das procianidinas captarem RL. Relativamente a esta temática pensa-se que os dímeros e trímeros de procianidinas são mais eficazes contra o anião superóxido que as unidades monoméricas. (Upadhyay, Kumar, Kumar, & Mishra, 2010)



**Fig.7:** Fontes e respostas celulares associadas às espécies reativas (ER) de oxigénio (ERO), de nitrogénio (ERN), derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCL), de carbono (ERC) e metais de transição [M<sup>n+</sup>].

Adaptado de (Em et al., 2007)

Os mecanismos anti-oxidantes estão associados à supressão da formação de ERO/ERN através da inibição de enzimas ou de mecanismos de quelação de metais e relacionam-se também com a captação das espécies reativas e com a regulação positiva

ou ativação do sistema anti-oxidante responsável por exercer mecanismos defensivos face ao stress oxidativo. (Upadhyay et al., 2010)

A peroxidação lipídica é definida como uma sequência de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres em lípidos insaturados presentes nas membranas celulares. Constitui uma das principais consequências do stress oxidativo, levando à alteração da membrana por interferência com a permeabilidade, alteração do fluxo iónico e de outras substâncias, resultando na perda da seletividade na entrada/saída de nutrientes e substâncias tóxicas, na alteração de DNA, oxidação de LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. As proantocianidinas protegem os lípidos dos danos causados por este mecanismo. (S Kumar, Mishra, & Pandey, 2013)

Os iões metálicos livres (metais de transição) são responsáveis por aumentar a produção de espécies reativas, através da reação com outros compostos, uma vez que sofrem reações redox. Torna-se necessário o transporte destes iões associado a proteínas para impedir a ocorrência destas reações. As PAs são termodinamicamente estáveis e capazes de quelar iões metálicos e por isso são capazes de reduzir as concentrações de radicais livres circulantes e potencialmente oxidantes. (Upadhyay et al., 2010).

A estabilidade do radical flavonóide formado depende da sua capacidade de deslocar um eletrão desemparelhado. A conjugação entre o anel A e B dos flavonóides permite a aquisição específica de uma ressonância no núcleo aromático que proporciona a estabilidade do radical flavonóide, graças à deslocalização do eletrão desemparelhado e às ligações de hidrogénio estabelecidas. A eliminação de radicais livres é potenciada pela presença destes elementos estruturais. (Andrade, Seneda, & Alfieri, 2010)

A lipofilicidade dos flavonóides traduz a integração dos mesmos nas membranas celulares, que são alvo de ação de ERO/ERN. Posto isto, deve estar presente uma concentração mínima de flavonóide por ácido gordo, de modo a garantir a presença destes compostos perto do local de ação das espécies reativas. Os flavonóides portadores de açucares são muito polares, o que significa que não são assimilados pela membrana, no entanto ficam armazenados em vesículas, acabando por persistir no organismo durante um maior período de tempo. Os flavonóides assimilados pelas membranas executam funções moduladoras na fluidez desta estrutura celular e desta forma estes compostos acabam por impedir a difusão de ERO/ERN, diminuindo a cinética responsável pelo stress oxidativo, como se verifica na presença de PAs (Cerqueira et al., 2007)

Em suma, os compostos fenólicos podem ser classificados como primários ou secundários de acordo com a sua atividade anti-oxidante. O mecanismo de ação dos AOX primários prende-se com o facto destes compostos interferirem com a cadeia transportadora de eletrões através da doação de eletrões e hidrogénio aos radicais livres conduzindo à formação de produtos termodinamicamente estáveis que reagem com os RL e formam um complexo lipídico-oxidante evitando o dano oxidativo. Os AOX secundários atrasam o início da auto-oxidação por múltiplos mecanismos diferentes como a complexação de metais, captação de oxigénio, absorção da radiação UV ou desativação de singuletos de oxigénio, bem como a decomposição de peróxido de hidrogénio que resulta na formação de espécies não reativas. As PAs interrompem as reações auto-oxidativas respetivas aos radicais livres prevenindo a auto-oxidação. As Proantocianidinas podem atuar como AOX primários ou secundários, mediante o mecanismo interveniente, a estrutura do composto AOX e o local de ação.

Vários dados sugerem que o stress oxidativo tem participação ativa nos mecanismos de envelhecimento, transformação e morte celular que influenciam o desenvolvimento de processos patológicos como o cancro, doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide entre outros. (S.Machado R. Ribeiro, J. Queiroz, 2005)

## **1.2 Atividade Anti-inflamatória das PAs**

O processo inflamatório pode ser definido como uma sequência de episódios que ocorrem em resposta a estímulos nocivos, infeções ou trauma. Os sinais mais comuns de inflamação são: o rubor, o inchaço, a dor, o calor e a perda de função dos tecidos lesionados. Os mecanismos inflamatórios induzem uma vasta gama de mediadores químicos, que intervêm no tratamento deste estado patológico. (Vikrant & Arya, 2011) A inflamação é um processo que envolve uma resposta imune inata e relaciona-se com a coagulação sanguínea, imunidade celular/humoral, citocinas, hormonas tecidulares, angiogénese e processos de reparação de tecidos danificados. As substâncias inflamatórias e as espécies reativas produzidas por células inflamadas também interferem com os tecidos não lesados, uma vez que agridem as células circundantes causando dano oxidativo tecidular e aumento do estado de inflamação. A inflamação crónica está associada a uma panóplia de doenças como o cancro, doenças neurológicas, metabólicas e cardiovasculares, que se desenvolvem de forma progressiva através do

estado inflamatório. No local inflamado ocorre a migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos, bem como a libertação de mediadores que promovem a junção de células inflamatórias e libertação de espécies reativas de oxigénio (ERO), nitrogénio (ERN) e ainda citocinas pró-inflamatórias capazes de atuar contra agentes patogénicos. (Pan, Lai, & Ho, 2010)

A regulação dos genes inflamatórios dos macrófagos e células epiteliais baseia-se na modulação da via NF- $\kappa$ B, no rearranjo da estrutura da cromatina, na ativação do fator nuclear redox (Nrf2) e ainda na variação da biossíntese da glutatona que influencia o efeito de captação de ERO pela via da glutatona peroxidase (GSH).

As ERO têm um papel fundamental no processo inflamatório, uma vez que elevam este estado, através da ativação da via NF- $\kappa$ B, de fatores de transcrição AP-1, e da acetilação/ desacetilação nuclear da histona. (I. Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006)

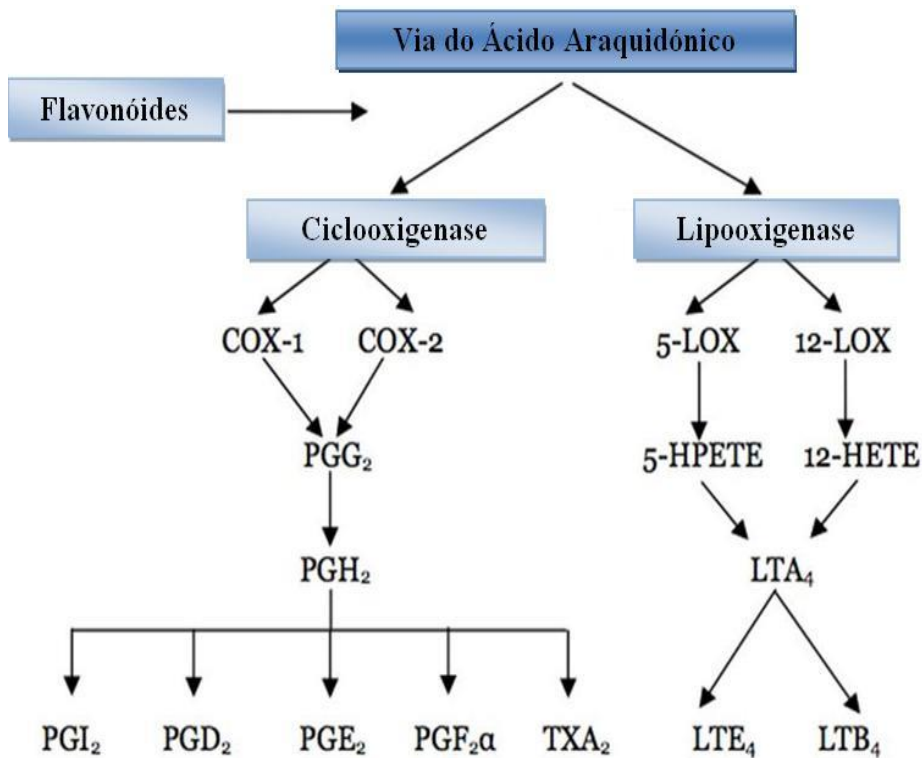
Os flavonóides interferem especificamente com as funções enzimáticas integradas no processo inflamatório através da inibição das proteínas quinase (PK). As PAs estabelecem ligações competitivas com as enzimas ATP, associadas à transdução do sinal e à ativação de mecanismos imunológicos, inibindo a expressão de óxido nítrico sintetase (NOS), ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase, o que se traduz na inibição da produção de óxido nítrico, leucotrienos e citocina TNF- $\alpha$ , sendo estas responsáveis pela indução da apoptose e inibição da via NF- $\kappa$ B. (González et al., 2011)

O processo inflamatório pode ser diminuído através das proantocianidinas que bloqueiam a produção de IL-8 nas células epiteliais e modulam a síntese de prostaglandinas através da via EGR-1/Erk, o que resulta da diminuição da regulação de COX-2. Similarmente as procianidinas B2 inibem a expressão da COX-2, através do bloqueio de AP-1, NF- $\kappa$ B, MEK e ERK. As PAs conferem resistência às células epiteliais humanas, protegendo-as do stress oxidativo, através da sua intervenção na via ERK, p38, MAPK e Akt. (González et al., 2011)

As proantocianidinas medeiam a adesão e a circulação de leucócitos nos locais lesionados, estes mecanismos interferem com a via MAPK e NF- $\kappa$ B e envolvem a diminuição da regulação de VCAM-1 e seletina-E. A redução da exocitose endotelial através das PAs desencadeia a circulação de leucócitos e inflamação vascular, através da fosforilação Akt e estimulação de óxido nítrico sintetase (eNOS) que por sua vez

conduz à diminuição da adesividade.

As PAs são potentes inibidores da produção de prostaglandinas e da adesão plaquetária pela inibição do metabolismo do ácido araquidônico e da inibição da fosfodiesterase do AMP cíclico. (Shashank Kumar & Pandey, 2013a) (Figura 8)



**Fig.8:** Esquema da ação dos flavonóides na via do ácido araquidônico da membrana fosfolípídica.

Retirado de (H. Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, 2011)

Em suma, as proantocianidinas exibem características anti-inflamatórias e exercem a sua atividade em várias estruturas celulares diferentes, através da redução da expressão e/ou função de uma panóplia de mediadores inflamatórios que incluem óxido nítrico (NO), moléculas adesivas e citocinas. (Tabela 1) O impacto dos flavonóides é abordado de forma generalizada e não específica porque a via NF- $\kappa$ B é o principal

regulador comum a todos estes mediadores, embora de acordo com a estrutura individual de cada um deles poderá haver variâncias específicas na sua forma de ação. Este modelo encaixa-se noutras vias de sinalização como PI3K-Akt ou MAPK, que em parte canalizam a sua atividade para a ativação da via NF- $\kappa$ B ou desempenham funções complementares. (González et al., 2011)

	Mecanismo Anti-inflamatório	Efeito
<b>Proantocianidinas</b>	Inibição das Proteínas Quinase	Alteração da expressão das enzimas que participam no processo inflamatório.
	Inibição NOS, COX e Lipooxigenase	Inibição NO, Leucotrienos e TNF- $\alpha$ .
	Bloqueio AP-1, NF- $\kappa$ B, MEK e ERK	Diminuição da produção de cictocinas inflamatórias.
	Inibição do metabolismo do ácido araquidónico	Inibição da adesão plaquetária e da produção de PG.

**Tabela 1:** Quadro resumo da Atividade Anti-inflamatória das proantocianidinas

### 1.3 Atividade Antisséptica das PAs

Ao longo dos tempos têm sido feitos vários estudos na área dos flavonóides com o objetivo de apurar quais as propriedades biológicas das proantocianidinas. Verificou-se que as PAs possuem atividade anti-microbiana. (Upadhyay et al., 2010)

A capacidade anti-bacteriana das PAs é inespecífica uma vez que estes compostos podem atuar em várias estruturas celulares diferentes. Uma das suas principais ações moleculares está relacionada com a capacidade das PAs formarem complexos com proteínas não específicas através do estabelecimento de ligações de hidrogénio e ligações covalentes e ainda através da sua atividade hidrofóbica. O carácter anti-microbiano destes compostos, pode ser descrito pela capacidade das PAs inativarem as adesinas microbianas, bem como as enzimas e proteínas transportadoras. Os flavonóides lipofílicos podem atuar ao nível das membranas celulares, uma vez que são capazes de causar o rompimento destas estruturas. De acordo com investigações científicas realizadas *in vitro*, foi comprovado que as proantocianidinas exercem atividade anti-bacteriana contra *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans* e *Shigella*. (Mishra, Mishra,

Kehri, Sharma, & Pandey, 2009)

As catequinas mostraram inativar a toxina da cólera produzida por *Vibrio cholerae*, e inibir a glucosiltransferase de *Streptococcus mutans*, através de atividade de complexação, em ambos os casos. A epigalocatequina é conhecida por inibir a síntese de DNA no *Proteus vulgaris*. Mori et al. sugere que o anel B presente na estrutura dos flavonóides pode formar ligações de hidrogénio com os ácidos nucleicos da bactéria, o que leva à inibição da síntese de DNA e RNA em microrganismos patogénicos. (Shashank Kumar & Pandey, 2013)

A relação estabelecida entre a atividade anti-bacteriana e a interferência com a membrana, apoiam a teoria de que os flavonóides exercem a sua atividade através da redução da fluidez da membrana das células bacterianas. O mecanismo de ação apresentado pelas PAs é similar ao mecanismo que ocorre nos antibióticos. Neste compostos químicos, dá-se a inibição da cadeia respiratória responsável por fornecer energia necessária para a biossíntese de várias macromoléculas essenciais para o crescimento bacteriano. Pensa-se que o local de inibição dos flavonóides se situa na cadeia respiratória bacteriana transportadora de eletrões entre CoQ e o citocromo C. (Shashank Kumar & Pandey, 2013)

Segundo Harmidy et al., as CPACs (proantocianidinas do arando) conferem proteção às células epiteliais, através de alterações do citoesqueleto da célula hospedeira face às infeções causadas por *E.Coli* (EPEC) e *salmonela typhimurium*. As CPACs são capazes de quelar metais e bloquear a motilidade por interferência estereoquímica entre as bactérias e a superfície alvo. Segundo este estudo, o impacto das CPACs ocorre diretamente na célula hospedeira durante a interação patogénica com a bactéria. A maioria das infeções entéricas estão associadas a estes dois importantes agentes patogénicos: a *E.Coli* (EPEC) (considerada a maior causa de diarreia infantil) e a *salmonela typhimurium* (responsável pela salmonelose). A EPEC e a *salmonela typhimurium* apoderam-se do mecanismo de funcionamento da célula hospedeira e causam infeção. As CPACs manipulam a actina do citoesqueleto da célula hospedeira e inibem a adesão das células que integram estes dois agentes patogénicos, bloqueando a invasão bacteriana por um mecanismo não específico, evitando a liderança das bactérias e prevenindo a formação de actina que ocorre na infeção. (Harmidy et al., 2011)

Diversos estudos relacionam as propriedades descritas das PAs com o efeito positivo em diferentes patologias associado à ingestão de alimentos ricos em PAs ou em suplementos, como nutracêuticos.

## **2. Papel das Proantocianidinas na doença**

### **2.1 Obesidade**

A obesidade relaciona-se com a inflamação crónica, sendo responsável por aumentar o risco de aparecimento de diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, cancro, dislipidémia e doença renal crónica. O aumento da taxa de mortalidade associada a estas patologias está fortemente relacionado com a morbilidade induzida pela obesidade e apresenta atividade negativa perante a longevidade do ser humano, uma vez que reduz acentuadamente a esperança média de vida, em cerca de 5 a 20 anos em indivíduos obesos. (Tateya, Kim, & Tamori, 2013)

O grau metabólico de inflamação desencadeado por esta patologia é designado por “meta-inflamação” e resulta do excesso crónico de nutrientes. (Dixit, 2008)

A obesidade compromete os mecanismos celulares e moleculares das células imunitárias vigilantes, desregulando a resposta imunitária no organismo. (Chuang & McIntosh, 2011)

O excesso de tecido adiposo resulta do balanço crónico de energia positiva durante a fase obesa e está associado à alteração de fatores neuroendócrinos que regulam o metabolismo da imunidade. Na obesidade, as células imunitárias estendem-se até ao tecido adiposo e verifica-se o aumento do número de adipócitos no timo e na medula óssea. Os fatores endógenos e exógenos responsáveis pela proliferação de pré-adipócitos conduz ao aumento da massa do tecido adiposo (WAT) e ao desenvolvimento da obesidade. (Chuang & McIntosh, 2011)

O tecido adiposo não se resume a um local de armazenamento de excesso de energia. Este órgão endócrino secreta substâncias biologicamente ativas (adipocinas) como TNF- $\alpha$ , resistina, adiponectina e leptina. Estas substâncias são responsáveis por regular a tolerância de insulina no fígado e músculo esquelético. A desregulação da secreção de adipocinas, verificada na expansão do tecido adiposo em indivíduos obesos, mostrou contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina e aparecimento de doenças metabólicas, como se verifica na inflamação crónica (IC). (Tateya et al., 2013)

A obesidade é caracterizada pela acumulação de macrófagos no tecido adiposo e inclui a incorporação de lípidos favorecendo a inflamação crônica. (Tateya et al., 2013) Os macrófagos tecidulares presentes no tecido adiposo (ATMs) produzem quantidades excessivas de mediadores pró-inflamatórios, sendo responsáveis pelo aparecimento da resistência à insulina na diabetes do tipo 2. Os ATMs produzem TNF- $\alpha$  (considerada uma adipocitocina pró-inflamatória) responsável por induzir a produção do radical NO através da indução enzimática óxido nítrico sintetase (NOS). Este mecanismo leva ao stress oxidativo no tecido adiposo, causando danos tecidulares e metabólicos. (Dixit, 2008) Por outro lado, a neutralização da expressão de TNF- $\alpha$  diminui a resistência à insulina (Tateya et al., 2013)

A MCP-1 é uma proteína de baixo peso molecular, segregada por adipócitos e pertencente à família das quimiocinas, apresenta-se aumentada no tecido adiposo durante a fase obesa, sendo responsável pelo aumento da infiltração dos macrófagos no tecido. Este fator induz a deslocação dos monócitos para o tecido adiposo desencadeando reações inflamatórias. Os monócitos infiltrados diferenciam-se em macrófagos que produzem citocinas inflamatórias responsáveis por induzir a resistência à insulina no fígado e no músculo esquelético através das adipocitocinas. As MAPK induzem o aumento da expressão e da atividade de MCP-1, que leva ao aumento das concentrações deste fator no plasma induzindo a esteatose hepática e a inflamação no tecido adiposo. (Tateya et al., 2013)

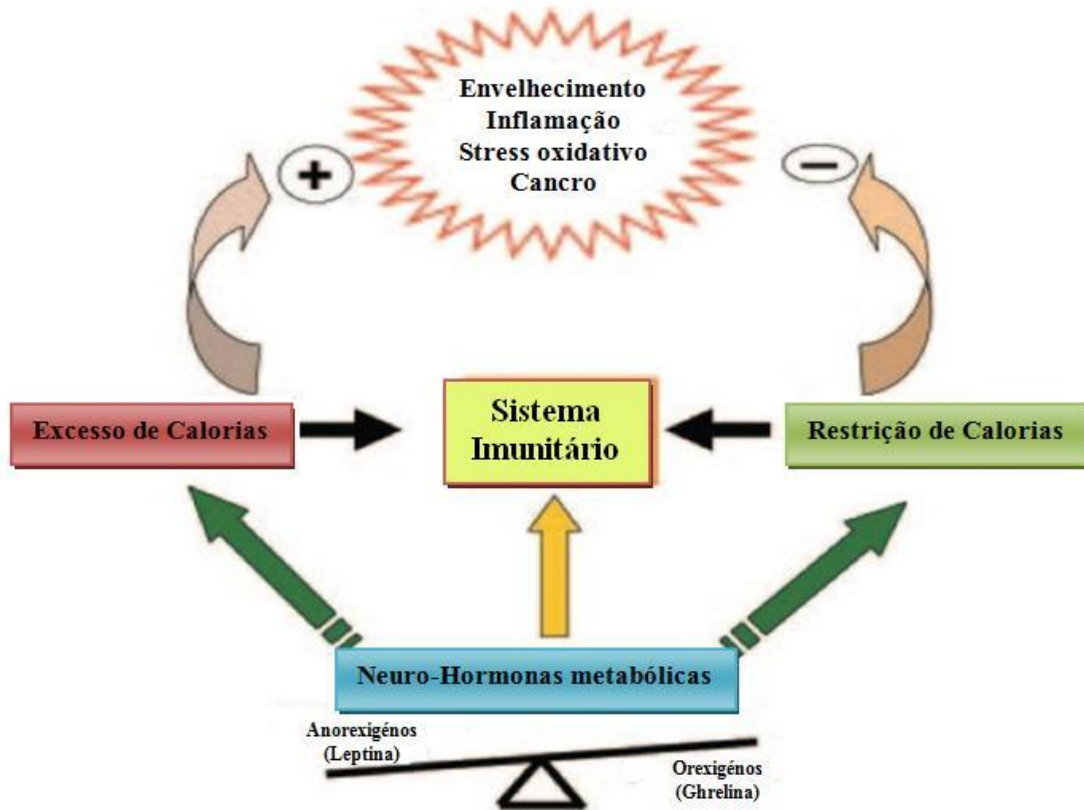
A restrição calórica (CR) é caracterizada pela redução da ingestão de calorias, sem que ocorra desnutrição. O mecanismo biológico que suporta a CR assenta na hipótese de redução da gordura corporal, sinalização da insulina e na redução da produção de espécies reativas minimizando os danos oxidativos. A alteração fisiológica ocasionada pela baixa ingestão de energia leva à redução da concentração de glicose no sangue, conduzindo à diminuição da produção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas e consequentemente à diminuição do armazenamento de tecido adiposo. A alteração do depósito de gordura pode conduzir à modificação da secreção de adipocitocinas, favorecendo a libertação de adiponectina e inibindo a libertação de TNF- $\alpha$  melhorando a sensibilidade à insulina no tecido hepático e muscular. As ERO são produzidas durante a respiração celular e são espécies fortemente reativas que interagem com os lípidos, proteínas ou ácidos nucleicos causando oxidação. Estas espécies ativam o fator

de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B responsável pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL). Pensa-se que a CR minimiza os danos oxidativos através da supressão da expressão de NF- $\kappa$ B. (Centenaro, Ubirajara, Guarienti, & Viganó, 2010)

Em suma a (CR) regula uma panóplia de mecanismos associados à resposta imunitária. As funções imunológicas celulares são também reguladas por péptidos neuroendócrinos como a grelina e a leptina. A leptina é uma molécula bioativa secretada por adipócitos que regula a ingestão de alimentos e o gasto energético, através do hipotálamo. A grelina é um potente inibidor das citocinas pró-inflamatórias e funciona ainda como mediador primário dos efeitos causados pela CR. (Dixit, 2008) (Figura 9)

A CR associada ao fator idade traduz-se num aumento da circulação de grelina, como resultado da hipertrofia das camadas celulares. Este mecanismo inibe a secreção de leptina responsável por aumentar as citocinas pró-inflamatórias das células imunitárias. A obesidade suprime a grelina e aumenta a circulação de leptina, que se traduz num aumento da inflamação. Dados clínicos sugerem que a obesidade é uma patologia crónica que está associada ao estado pró-inflamatório. (Dixit, 2008)

Os ácidos gordos livres contribuem significativamente para a inflamação crónica, uma vez que ativam a proteína quinase C (PKC) e ERO desencadeando um aumento do stress oxidativo do reticulo endoplasmático. Os ácidos gordos livres (SFA) conduzem ao aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  que causam endotoxémia. (Chuang & McIntosh, 2011)

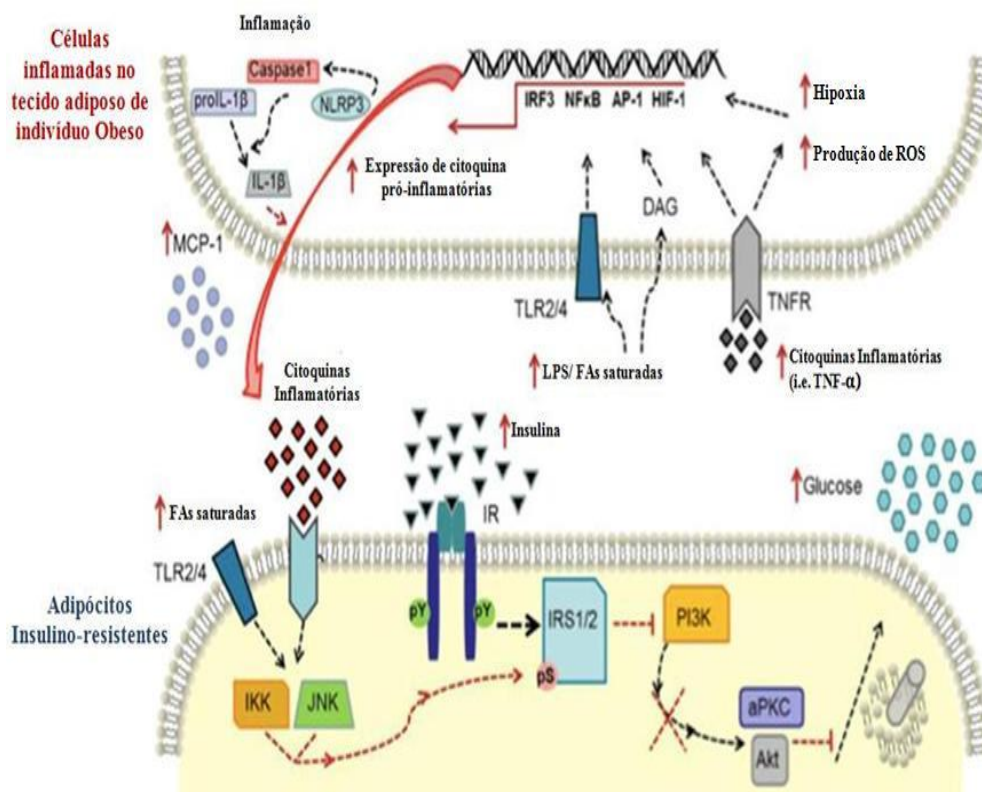


**Fig.9:** Obesidade Vs Regulação da restrição calórica. Adaptado de (Dixit, 2008)

O mecanismo de ação proposto para as PAs na redução da obesidade implica a inibição de citocinas pró-inflamatórias e as endotoxinas metabólicas que ativam a inflamação através das vias MEK/MAPK, TNF- $\alpha$  e AP-1, as quais aumentam a expressão dos genes inflamatórios (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , MCP-1) e a regulação negativa de insulina. (Chuang & McIntosh, 2011) (Figura 10) As proantocianidinas apresentam atividade anti-inflamatória por supressão da via NF- $\kappa$ B, supressão da sinalização extracelular regulada pelas proteínas quinases (PK) e ainda através da ativação da via SIRT1. (Tateya et al., 2013)

As proantocianidinas presentes na uva protegem as células contra o stress oxidativo através da oxidação da via GSH ou através da neutralização das espécies reativas de oxigénio (ERO), das espécies reativas de nitrogénio (ERN) e de metais de transição. Isto deve-se ao facto das PAs diminuírem a atividade enzimática de oxidase NADPH e óxido nítrico sintetase (NOS). Estas enzimas são responsáveis pela produção de ERO e ERN, respetivamente. A supressão da cascata de sinalização da inflamação que induz ASK1 e a diminuição da regulação MAPK leva à transcrição de enzimas anti-oxidantes

como a glutatona peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) que ajudam no combate ao stress oxidativo. (Chuang & McIntosh, 2011)



**Fig.10:** Mecanismos de inflamação induzidos pelo processo de resistência à insulina. Retirado de (Johnson, Milner, & Makowski, 2013)

Em suma, o carácter anti-inflamatório das proantocianidinas deve-se: ao aumento da expressão proteica de genes anti-oxidantes, à diminuição do stress no retículo endoplasmático, ao bloqueio das citocinas pró-inflamatórias ou endotoxinas mediadas por proteínas quinases e factores de transcrição, à supressão da inflamação ou indução da expressão genética responsável pelo o aumento da atividade da desacetilação da histona, ou á ativação de factores de transcrição que antagonizem a inflamação crónica.

## 2.2 Diabetes

A diabetes é uma desordem metabólica crónica associada ao metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, onde se verifica o comprometimento absoluto ou relativo da utilização de glucose e secreção e/ou ação da insulina. Esta patologia representa um problema de saúde pública. (Drouin et al., 2010)

A hiperglicemia induzida pelo stress oxidativo e verificada na diabetes estimula o desenvolvimento de complicações microvasculares, como a nefropatia. (Kanasaki, Taduri, & Koya, 2013) Este estado patológico integra mecanismos que aceleram as reações de glicação, sendo a principal a auto-oxidação da glucose (Perkins et al., 2012) Na nefropatia diabética verifica-se o aumento do stress oxidativo e redução do estado anti-oxidante, com um aumento da produção de ERO que se traduz em toxicidade para as células. (Oudit et al., 2010) A hiperglicémia promove a glicosilação avançada de proteínas circulantes e celulares que dão início a uma sequência de reações auto-oxidativas que culminam na formação de produtos finais nas proteínas tecidulares. (AGE) Os produtos resultantes da glicosilação avançada têm potencial de oxidação elevado conduzindo a danos tecidulares provocados por radicais livres. (Henriksen, Diamond-Stanic, & Marchionne, 2011)

O aumento da peroxidação lipídica nas membranas celulares causado pelas ERO pode ser a razão plausível para estes distúrbios, uma vez que estes compostos estimulam a degradação de DNA, lípidos e hidratos de carbono conduzindo à hiperglicemia e auto-oxidação da glucose. (Fogarty et al., 2011) As GSPE inibem a formação de AGE através da sua potencial capacidade de captação de radicais livres e mostraram reverter os efeitos causados pela peroxidação lipídica. (Yokozawa, Noh, & Park, 2012)

A ativação do processo glicémico induz a produção de mediadores secundários (PKC e MAPK) e citocinas, ambos responsáveis pelo stress oxidativo que se verifica na lesão renal. (Singh, Winocour, & Farrington, 2011)

Os pacientes diabéticos têm os níveis de leptina e ácidos gordos aumentados (K. Rahman, 2007), o que contribui para o aumento dos níveis de ERO, além de se verificar uma diminuição da atividade enzimática anti-oxidantes devido aos mecanismos de glicação presentes nesta patologia (Kashihara, Haruna, Kondeti, & Kanwar, 2010)

Vários estudos reconhecem que os flavonóides têm propriedades clínicas interessantes, uma vez que possuem características protetoras face à diabetes, pelo aumento da atividade de enzimas anti-oxidantes. (Yokozawa et al., 2012)

### **2.3 Doença cardiovascular**

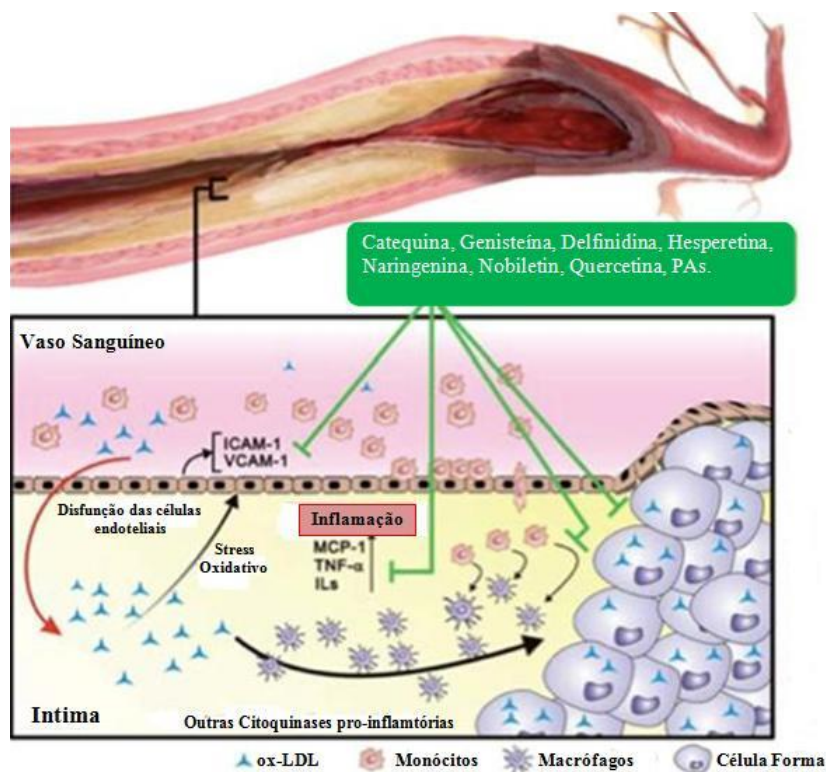
A doença cardiovascular (CVD) é desencadeada por desordens ocorridas no coração e nos vasos sanguíneos e incluindo doença coronária (ataque cardíaco), doença cerebrovascular (AVC), o aumento da pressão arterial (hipertensão), doença arterial

periférica, doença cardíaca reumática, a cardiopatia congênita, insuficiência cardíaca entre outras. (Dennery, Sugamura, & Keaney, 2011) Os vasos sanguíneos são constituídos por uma camada de endotélio vascular e outra de tecido muscular. A perturbação desse equilíbrio leva à disfunção do tecido endotelial, o qual afeta o tónus vascular e causa danos na parede das artérias conduzindo à CVD. (Libby & Theroux, 2005) O endotélio vascular tem elevada importância na regulação da homeostase vascular, na inibição da adesão dos leucócitos e na agregação plaquetar induzida por mediadores como o óxido nítrico (NO). (Higashi, Noma, Yoshizumi, & Kihara, 2009) O aumento da produção de NO juntamente com o risco endotelial celular e o aumento do stress oxidativo levam à alteração da integridade vascular e à redução da capacidade vasodilatadora o que origina disfunções endoteliais. Este processo facilita a pró-coagulação, a qual induz a trombose e pode resultar no enfarte agudo do miocárdio (EAM), caracterizado pela insuficiência cardíaca e arritmias. As proantocianidinas diminuem o stress oxidativo, através da captação de ERO e inibem a agregação plaquetar, bem como as metaloproteinases e desta forma as PAs vão ter um papel crucial na redução dos efeitos causados por CVD. (Mladenka, Zatloukalová, Filipický, & Hrdina, 2010) (Tabela 2)

<b>Doenças cardiovasculares</b>	<b>Mecanismo de ação proposto das PAs</b>
Aterosclerose	Diminuição da oxidação de LDL por diminuição do stress oxidativo; Inibição da adesão dos leucócitos; Diminuição da expressão de iNOS e COX-2
Enfarte Agudo do Miocárdio	Diminuição de ROS; Inibição da agregação plaquetar
Insuficiência Cardíaca	Diminuição do stress oxidativo (por captação de ROS); Inibição das metaloproteinases
Arritmia	Diminuição do stress oxidativo
Hipertensão	Propriedades vasodilatadoras; Inibição de NADPH oxidase

**Tabela 2:** Quadro resumo da influência dos flavonóides nas CVD.

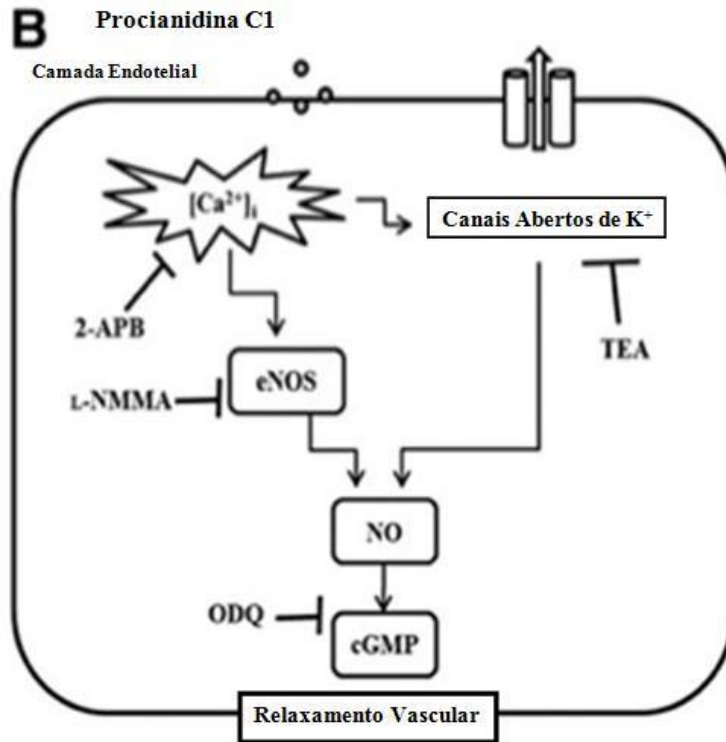
A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, sendo um dos principais fatores responsáveis pela origem de doenças cardiovasculares. Esta patologia caracteriza-se pela estimulação de colesterol, pela oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL) e pela atividade dos radicais livres que ativam as células do endotélio vascular sensibilizando as propriedades adesivas dos monócitos através da expressão das moléculas seletivas de adesão: molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) e molécula-1 de adesão intracelular (ICAM-1). (Mestas & Ley, 2008) O consumo de catequinas pode atenuar os efeitos produzidos pela aterosclerose caracterizada pela infiltração de monócitos/macrófagos e pela produção de citocinas pró-inflamatórias. As catequinas atuam ao nível da inibição das células adesivas, das citocinas inflamatórias e da infiltração dos macrófagos, reduzindo a resposta inflamatória induzida pela aterosclerose. (Libby, Okamoto, Rocha, & Folco, 2010) (Figura 11) As PAs inibem a oxidação de LDL, através de mecanismos que envolvem a captação de radicais livres e desta forma conseguem baixar os níveis de concentração de colesterol sanguíneo, bem como a pressão sanguínea. (Ishigaki et al., 2008)



**Fig.11:** Locais de ação das catequinas na aterosclerose. Adaptado de (Libby et al., 2010)

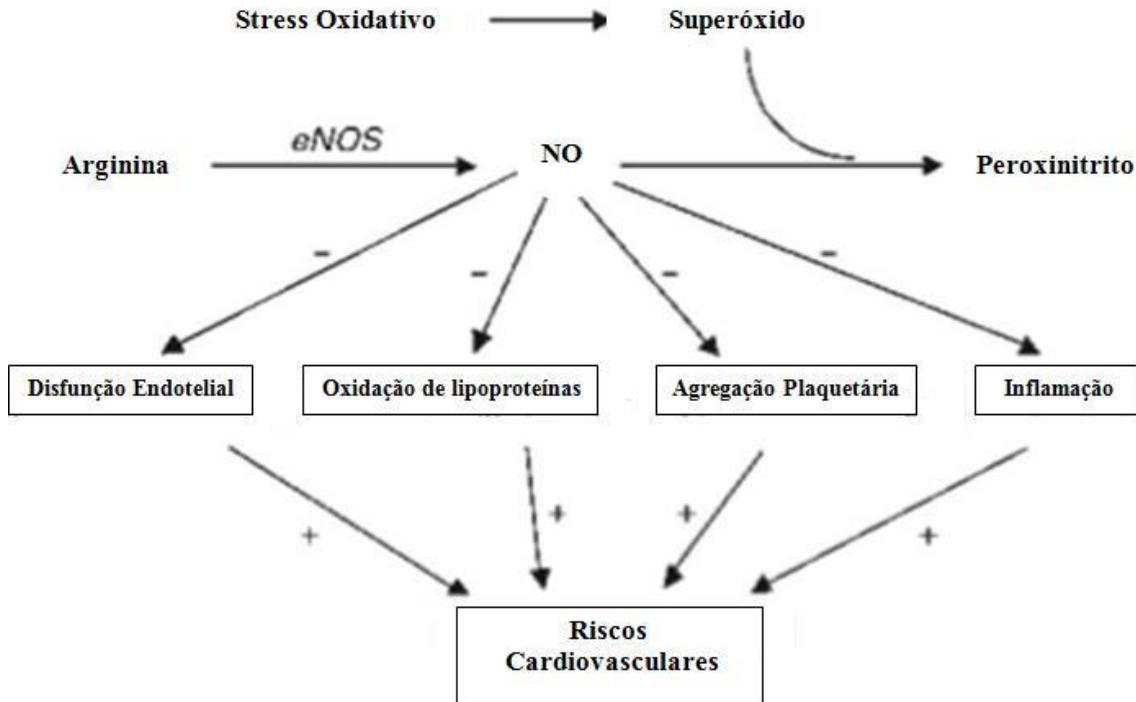
A hipertensão é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, esta é capaz de promover a remodelação vascular que conduz ao aumento da resistência periférica e ao aumento dos níveis de pressão sanguínea. (Brieger, Schiavone, Miller, & Krause, 2012) As células vasculares (células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos) intervêm na remodelação vascular e vários estudos sugerem que o endotélio é capaz de detetar alterações hemodinâmicas e reorganizar os componentes celulares e extracelulares pré-existentes. A remodelação celular ocorre na estrutura do vaso e envolve a proliferação celular, apoptose, migração, organização celular e interação com a matriz de integrin. (Yu et al., 2012) Verificou-se que a substância produzida pelo endotélio é essencial no processo de remodelação, uma vez que diminui o lúmen dos vasos, após a redução de fluxo sanguíneo a longo prazo. (Vita et al., 2008) Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a transformação do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 tem um papel relevante durante o desenvolvimento vascular, uma vez que intervêm no mecanismo de remodelação. O aumento da concentração de TGF- $\beta$ 1 na circulação sanguínea induz a ativação da NADPH oxidase, o que aumenta a produção de ERO acelerando o estado patológico da aterosclerose, da hipertensão e dos mecanismos de remodelação do miocárdio. A NADPH oxidase é responsável pela produção de 75% de iões superóxido presentes em doentes com doença arterial coronária. (Kuroda & Sadoshima, 2010)

Os alimentos ricos em flavonóides, sobretudo GSPE diminui o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares, uma vez que intervêm na regulação da pressão sanguínea sistólica e nos processos de remodelação. Estes compostos são potentes vaso-relaxantes do tecido endotelial. Esta propriedade atribuída às proantocianidinas deve-se à sua capacidade de estimular a formação de óxido nítrico (NO) através da indução enzimática de óxido nítrico sintetase (eNOS), o que leva à acumulação de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e posteriormente origina o vaso-relaxamento, diminuindo a pressão sanguínea. (Figura 12) As epicatequinas induzem a produção de óxido nítrico (NO) das células endoteliais através da hiperpolarização da via PI3K/Akt. (Brieger, Schiavone, Miller, & Krause, 2012)



**Fig.12:** Efeito das procianidinas nos níveis de cGMP. Retirado de (Byun et al., 2014)

A maioria dos dados científicos revelam que as desordens patológicas do coração e do sistema cardiovascular estão relacionadas com danos na via de sinalização da ERO. Estes processos lesivos para as células cardíacas surgem com o excesso de produção de ERO a partir das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e NO sintetase ou então através mecanismos normais fisiológicos sujeitos a alterações significativas por indução da ERO nas cascatas catalíticas. Existem vários fatores responsáveis pelos danos causados pelo excesso de produção de ERO como: o envelhecimento, a obesidade, a isquemia, a hipertensão, a alimentação rica em gorduras, os pró-oxidantes de baixo peso molecular, bem como determinados íons metálicos. (Figura 13) A ERO tem participação ativa nas cascatas enzimáticas que representam a expressão génica associada às patologias cardíacas. Fatores como PCK, MAPK, ERK, p38 e JNK têm um papel importante em todo este processo, uma vez que estas enzimas ou vias enzimáticas participam nos processos fisiológicos normais associados à via de sinalização ERO, sendo observado que a transformação do processo natural fisiológico em processo patológico está associado ao excesso de produção de espécies reativas, que em quantidades normais não causam efeitos prejudiciais no organismo. (Chen, Moghaddas, Hoppel, & Lesnefsky, 2008)



**Fig.13:** Diagrama dos efeitos do stress oxidativo na doença cardiovascular . Retirado de (Katz, Doughty, & Ali, 2011)

## 2.4 Artrite reumatoide

A artrite reumatóide (RA) pode ser descrita como uma doença sistêmica inflamatória caracterizada pela hiperplasia do tecido sinovial e destruição da estrutura conjunta. Esta patologia apresenta infiltração celular nas membranas sinoviais, erosão progressiva da cartilagem e osso, formação de pannus nas articulações afetadas, além de desencadear respostas auto-imunes contra componentes da cartilagem e presença de fatores reumatóides. A osteoporose caracteriza-se por um aumento da probabilidade da ocorrência de fraturas devido à fragilidade óssea, o que condiciona a qualidade de vida de um paciente com RA. Patologicamente, a RA assenta na invasão de osteoclastos no osso, cujo aumento da atividade conduz a danos graves, levando à destruição progressiva das articulações artríticas. O aumento da produção de citocinas inflamatórias (TNF-  $\alpha$ ) e células T patológicas está relacionadas com a destruição artrítica, o maior sintoma da artrite reumatoide. (H. Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, 2011) O colagénio tipo II é sintetizado no condroblasto, sendo a principal proteína estrutural responsável pela firmeza da cartilagem. Na RA, o organismo não reconhece esta proteína desencadeando reações auto-imunes que se prendem com a produção da enzima colagenase que provocam a quebra da cartilagem

conduzindo aos efeitos deletéricos da doença e aos seus respectivos sintomas. A hipersensibilidade imunológica leva à cronicidade da inflamação. (Ma et al., 2013)

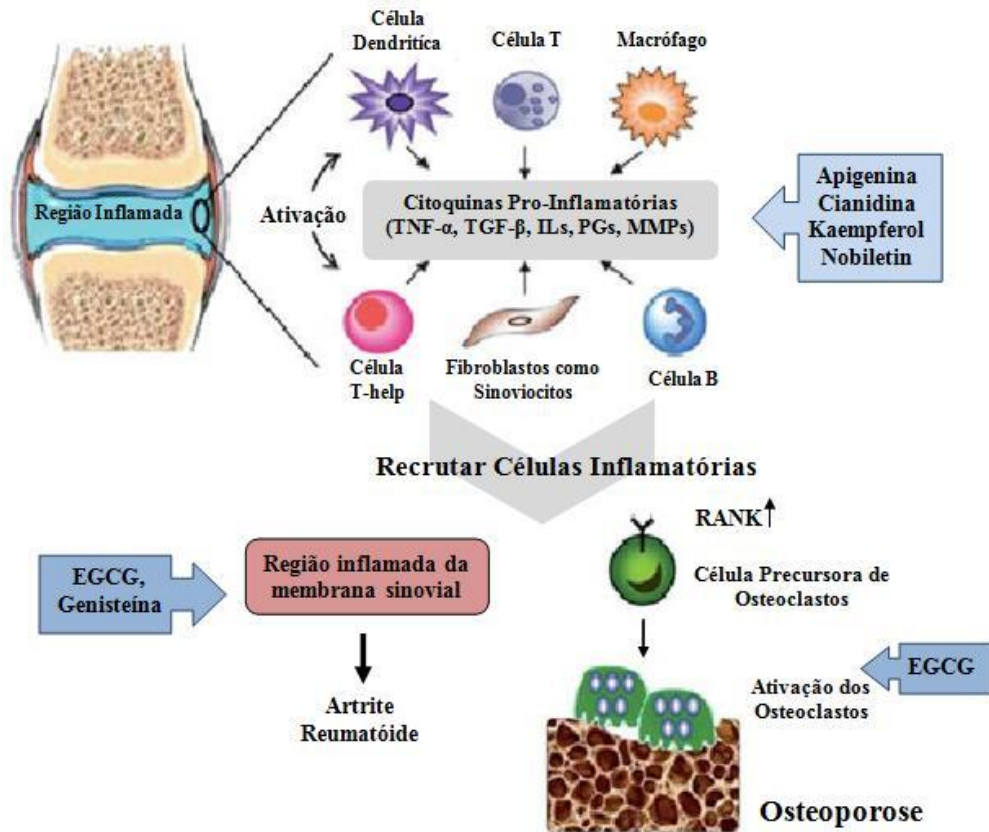
Os osteoclastos são células multinucleadas que exibem resistência à fosfatase ácida de tartarato (TRAP) e formam poços de reabsorção óssea. Este mecanismo requer a participação da enzima NADPH oxidase e revela um aumento da produção de ERO que induz o stress oxidativo aumentando o desenvolvimento do estado patológico. O factor RANKL (ativação do recetor nuclear do fator ligando kappa-B) é responsável pela ativação anormal de osteoclastos nas articulações artríticas, o que leva ao aumento da reabsorção e posterior destruição das articulações. (Park et al., 2012)

Os osteoblastos apresentam um papel fulcral na formação do osso, uma vez que sintetizam várias proteínas presentes na matriz óssea, regulam a maturação de osteoclastos e produzem fatores solúveis. (Park et al., 2012)

A homeostase óssea é mantida pelo equilíbrio entre dois processos de remodelação: a reabsorção por parte dos osteoclastos e a formação de osteoblastos. As GSPE desempenham um papel fulcral na homeostase, uma vez que suprimem a diferenciação de osteoclastos e promovem a diferenciação de osteoblastos, em simultâneo. (Ma et al., 2013) Estes compostos fitoquímicos são capazes de reduzir a IgG2a específica para colagénio do tipo II e para as citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) e desta forma diminuem a hipersensibilidade imunológica, reduzem a inflamação e favorecem a diminuição da destruição óssea causada pelo desequilíbrio entre os osteoclastos e osteoblastos. Posto isto, as GSPE visam ter um papel interessante do ponto de vista terapêutico, uma vez que é aconselhável a sua aplicação em concomitância com as terapêuticas anti-reabsortivas (anticorpo anti-TNF- $\alpha$  e anti-RANKL), no sentido de promover a formação óssea, suprimir a reabsorção deste constituinte, aumentar a captação de ERO reduzindo o stress oxidativo bem como reduzir o excesso de produção de citocinas inflamatórias responsáveis pela inflamação. Esta terapêutica com GSPE como tratamento adjuvante na destruição do osso, mostrou também eficácia no tratamento da osteoporose. (Pan et al., 2010) (Figura 14)

Em suma, o balanço entre atividade dos osteoblastos e osteoclastos é muito importante na manutenção da integridade óssea e a terapêutica baseada nas GSPE

mostrou ser vantajosa uma vez que melhora a regulação da homeostase do osso através da sua dupla ação, referida anteriormente. (Ma et al., 2013)



**Fig.14:** Mecanismo de inflamação associado à artrite reumatoide e osteoporose e respetiva ação das EGCG e cianidinas. Retirado de (Pan et al., 2010)

## 2.5 Cancro

A carcinogénese é um processo complexo e multi-sequencial, que se traduz na transformação de uma célula saudável, numa célula pré-cancerígena, que pode posteriormente originar uma patologia carcinogénica. O aparecimento de cancro pode ser explicado por dois mecanismos. Um dos mecanismos, ocorre na mitose e baseia-se no aumento da síntese de DNA, por ação de agentes carcinogénicos não genotóxicos que podem induzir mutações que levam à divisão descontrolada das células. Estas mutações podem levar à expansão clonal que dá início à transição do estado celular pré-neoplásico a estado celular efetivamente neoplásico. Outro dos mecanismos propostos assenta no desequilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular. Se ocorrer um dano no DNA excessivamente extenso, torna-se necessário eliminar seletivamente as

células alteradas. Este processo é designado por apoptose, a qual é caracterizada por um mecanismo celular fisiológico normal, que assenta na morte celular programada, quando ocorrem mudanças morfológicas. Durante a proliferação celular, a proteína p53 tem um importante papel, na manutenção da integridade do DNA. Em suma, quando ocorre dano celular, é ativado um mecanismo de apoptose realizado pelas p53, responsável por eliminar as bases oxidadas que causam mutações. (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006)

A apoptose, como já foi mencionado anteriormente, corresponde ao processo celular responsável pela destruição dos danos celulares ou células anormais. A regulação de NF- $\kappa$ B sensibiliza a indução da apoptose celular. Segundo a análise de Hsu et al. em estudos *in vitro*, as PAs podem induzir respostas apoptóticas em células cancerígenas do cólon. A apoptose celular induzida pelas PAs é mediada pelas proteínas da família Bcl-2. Algumas proteínas desta família (Bax e Bad) promovem a apoptose, enquanto que outras (Bcl-2 e Bcl-x) inibem este mesmo processo. Estas proteínas formam multímeros, que levam ao desenvolvimento de poros nas membranas, que controlam o fluxo molecular entre os compartimentos celulares. Estudos recentes revelam que a proporção de proteínas Bax:Bcl-2 é um fator determinante na transmissão do sinal da apoptose. As PAs medeiam a apoptose, pela alteração da proporção Bax:Bcl-2 nas células cancerígenas do cólon. (Hsu et al., 2012)

O processo de carcinogénese pode ser influenciado por agentes genotóxicos (geralmente químicos), que causam danos diretamente no DNA, levando a alterações mutagénicas, ou por compostos não genotóxicos, normalmente designados por epigénicos que atuam indiretamente nas reações dos mecanismos de DNA. Estes agentes modulam o crescimento e a morte celular. As PAs apresentam efetividade na captação das moléculas oxidadas associados ao dano no DNA e à promoção do tumor. (H. Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, 2011)

A interrupção da progressão do ciclo celular é um fator crucial no desenvolvimento de patologias cancerígenas. As ciclinas e as ciclinas dependentes de quinases (CDK) são proteínas muito importantes na interrupção da regulação do funcionamento do ciclo celular. As PAs marcam visivelmente a redução da expressão dos níveis de CDK2, CDK4, e CDK6. Similarmente, também reduzem os níveis de

ciclina D1, D2 e E. O aumento do nível dos inibidores das proteínas CDK, induzido pelas PAs, tem um papel crucial no aprisionamento das células cancerígenas na fase G1, através da inibição da atividade de CDK. Este processo conduz à morte celular das células cancerígenas por apoptose. (V. Nandakumar, T. Singh, 2008) As PAs inibem a proliferação das células cancerígenas (Hsu et al., 2012) e inibem a atividade proliferativa das células endoteliais *in vitro*, durante a angiogénese. (Kandaswami et al., 2005)

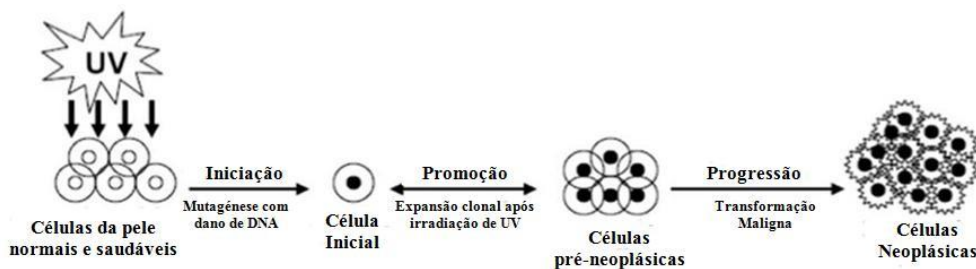
O consumo de alimentos ricos em flavonóides tem um papel crucial na prevenção do cancro. Vários estudos demonstraram que as proantocianidinas assumem um carácter quimiopreventivo e reduzem a incidência do cancro da próstata, pulmão, mama e estômago. (Gul, Ahmad, Kondapi, Qureshi, & Ghazi, 2013) A atividade preventiva destes compostos prende-se com a regulação negativa da proteína mutante p53, com a paragem do ciclo celular, com a inibição da tirosina quinase e com a capacidade de ligação aos recetores de estrogénio. As alterações de estrutura da p53 estão relacionadas com as mutações genéticas presentes no cancro. Os flavonóides são capazes de reduzir a expressão da p53 e a inibição desta proteína leva à paragem celular na fase G2-M, impedindo a progressão das células cancerígenas. (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011) Recentemente, várias investigações científicas provaram que as epigalocatequinas inibem a atividade da sintetase de ácidos gordos (FAT) que se apresenta significativamente aumentada em vários tipos de cancro e inibem também a lipogénese no cancro da próstata, estando este efeito fortemente associado à interrupção do ciclo celular. (Woo & Kim, 2013)

A tirosina quinase corresponde a uma proteína localizada perto da membrana celular e a sua expressão está associada à oncogénese. Esta proteína é responsável pela transdução de sinais associados a fatores de crescimento nucleares. Os flavonóides tem a capacidade de inibir a tirosina quinase pelo que medeiam o processo associado à oncogénese. (Woo & Kim, 2013)

No cancro da mama, fígado, cólon, pulmões e ovário, a invasão/metastização cancerígena está relacionada com a produção de uma matriz de metaloproteínases (MMPs) por parte das células carcinogéneas. Desta forma, para que ocorra invasão do tumor é necessário que haja secreção cancerígena de MMPs, pelo que a terapêutica contra determinados tumores assenta na administração de anticorpos ou inibidores de

MMP cancerígenas que impeçam esta a invasão. As PAs reduzem os níveis de MMPs, uma vez que estão associados à regulação da biossíntese destas proteínas. Os flavonóides inibem a ativação e proliferação de mastócitos, envolvidos no crescimento e metastização de tumores. (Kandaswami et al., 2005)

Os Comprimentos de onda UVA(320-400 nm) e UVB(280-320 nm) do espectro solar são absorvidos pela pele e produzem stress oxidativo que contribui para o desenvolvimento do cancro de pele, também designado por foto-carcinogénese. Esta patologia assume um carácter muito complexo, uma vez que está associada a múltiplos mecanismos, que sistematicamente podem ser divididos em 3 fases distintas: iniciação do tumor, associada a efeitos genotóxicos causados pela luz UV nas células normais; a promoção do tumor, que consiste numa expansão clonal das células iniciais, podendo ser considerado um processo reversível e a progressão do tumor associada à transformação maligna do papiloma presente no carcinoma, que surge na sequência de uma estimulação adicional genotóxica. (Katiyar, 2008) (Figura 15)

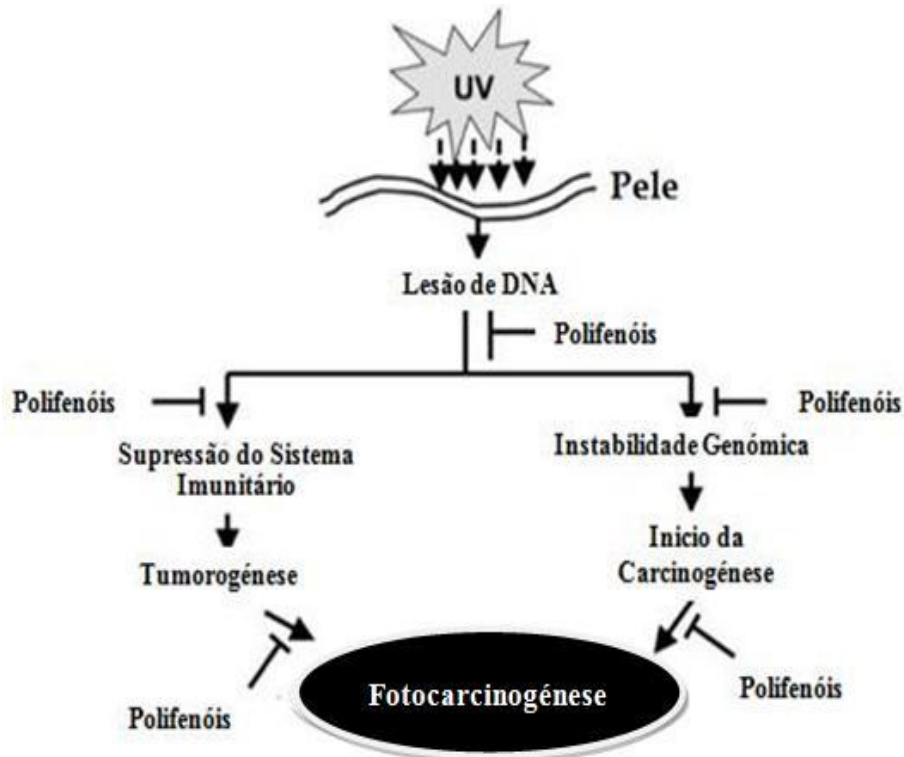


**Fig.15:** Representação esquemática dos múltiplos estágios da carcinogénese da pele, induzida pela radiação UV. Adaptado de (Katiyar, 2008)

O consumo de proantocianidinas reduz os efeitos causados pela exposição à radiação UVB que desencadeia a redução dos níveis de glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPs) e catalase. Estas enzimas apresentam importância significativa, uma vez que reduzem os níveis de stress oxidativo responsável por causar inflamação cutânea, oxidação lipídica/proteica e danos no DNA. O stress oxidativo induzido pelo UV, implica a ativação de proteínas MAPKs que são importantes fatores de regulação, que controlam atividades como a proliferação, diferenciação e apoptose celular, em

resposta a sinais ou estímulos. As GSPs (proantocianidinas presentes na uva) reduzem significativamente os níveis de óxido nítrico produzido durante a exposição a UVB e diminuem a fosforilação de proteínas MAPKs, incluindo ERK1/2, JNK e p38. O stress oxidativo induzido pelo UV, implica a ativação de proteínas MAPKs e a desregulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, associados ao processo da inflamação e da carcinogénese. O consumo de GSPs, reduz a expressão de NF- $\kappa$ B, COX-2 e prostaglandinas. Estes fatores estão envolvidos na carcinogénese da pele e promoção do tumor. As PAs reduzem a resposta hiperplásica, a atividade mieloperoxidase e o número de leucócitos inflamatórios infiltrados na pele, sendo este o principal responsável pela produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogénio, intervenientes na produção de stress oxidativo. (F. Afaq, 2011)

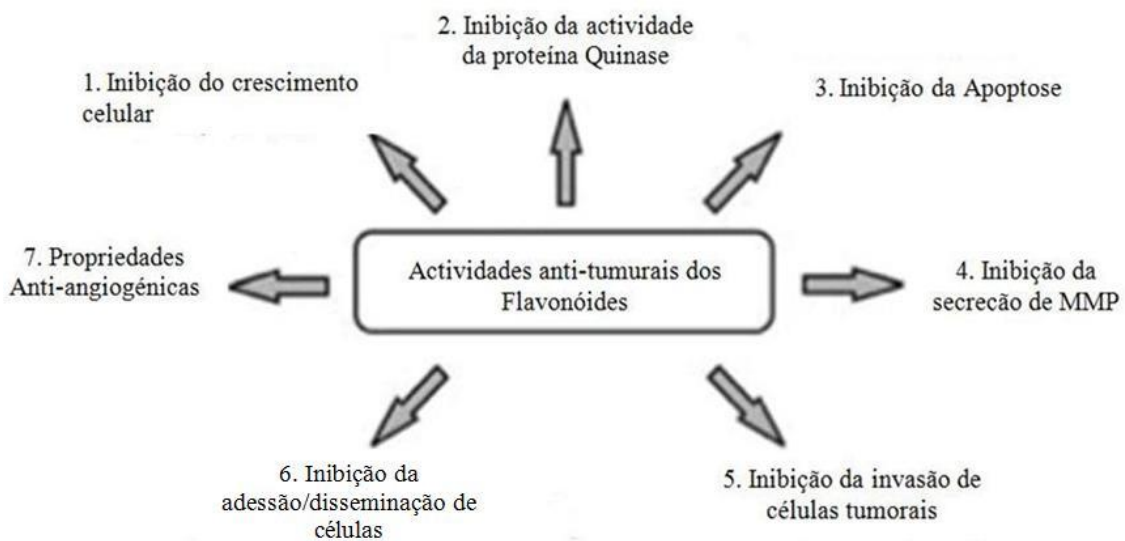
As células efectoras T CD8<sup>+</sup> secretam citocinas Th1, associado á supressão da resposta imunitária. Vários estudos revelam que GSPs previnem a imunossupressão induzida por UVB através a estimulação das células efectoras T CD8<sup>+</sup>, conduzindo á prevenção da foto-carcinogénese nos humanos. (F. Afaq, 2011) (Figura 16)



**Fig.16:** Diagrama dos mecanismos quimiprotectores dos polifenóis na fotocarcinogénese.

Adaptado de (F. Afaq, 2011)

A alimentação rica em PAs influencia de forma significativa os processos de imunidade celular associados ao desenvolvimento e progressão do cancro. Estes compostos são capazes de modular uma panóplia de eventos biológicos como a proliferação e diferenciação celular, apoptose e neovascularização que estão associados à progressão e desenvolvimento desta patologia. Os flavonóides apresentam atividade anti-tumoral e depressão da angiogénese in vivo. Estes compostos, atravessam as células e acumulam-se em determinados organelos celulares e tecidos, através de vários mecanismos relacionados com a atividade enzimática da proteína quinase C, da tirosina, da adesão focalizada das quinases e MMPs, relevantes na proliferação e metastização do cancro. (Kandaswami et al., 2005) (Figura 17)



**Fig.17:** Atividade anti-tumoral dos flavonóides. Adaptado de (Kandaswami et al., 2005)

A atividade anti-tumoral atribuída a estes compostos relaciona-se com a indução da apoptose, supressão da atividade da proteína tirosina quinase, apresentando efeitos anti-metásticos, anti-invasivos, e anti-angiogénicos. (Kandaswami et al., 2005) (Figura 18)

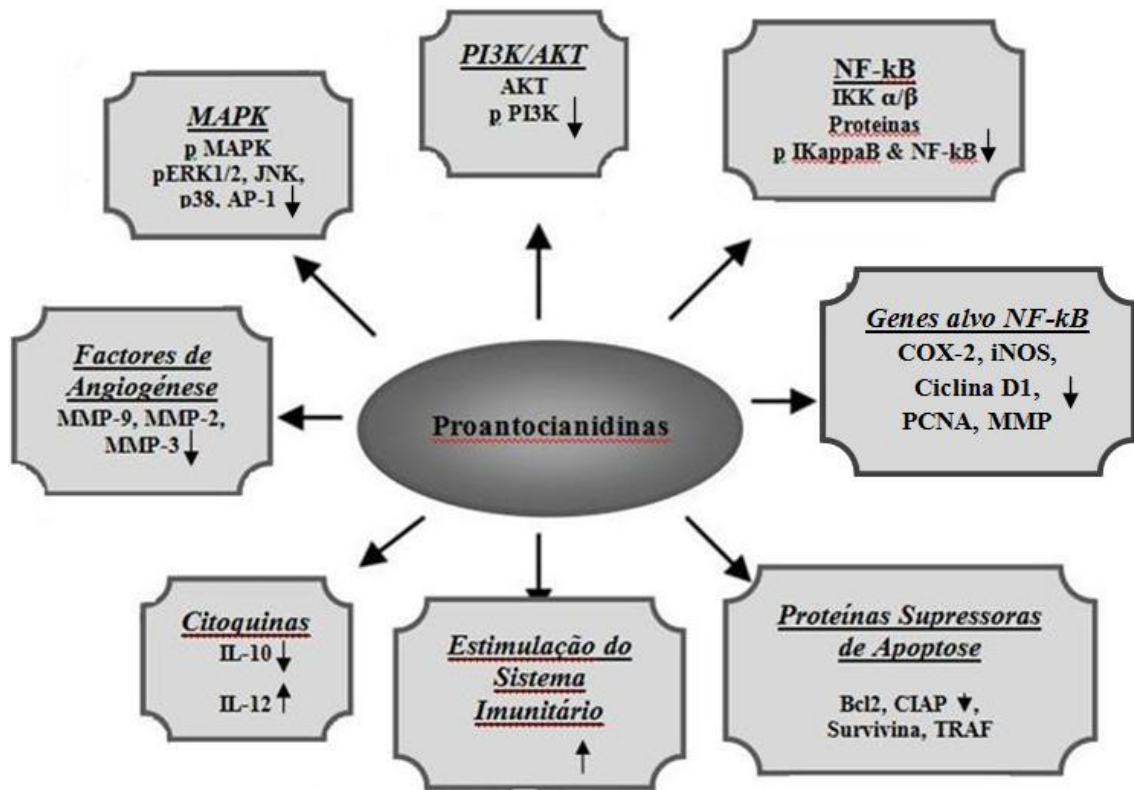


Fig.18: Mecanismos moleculares das proantocianidinas na prevenção do cancro (Adaptado de (V. Nandakumar, T. Singh, 2008)

As proantocianidinas são compostos capazes de absorver radiação UVB, UVA,UVC, pelo que atuam como filtros solares, tornando possível a redução da inflamação, do stress oxidativo e dos efeitos nocivos causados pela radiação na pele. Desta forma, conclui-se que a aplicação tópica de polifenóis assume um carácter fotoprotetor. (J. A. Nichols, 2010) (Tabela 3)

Polifenol	Alimento	Mecanismo de ação proposto
Catequinas	Folhas de chá	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,NO,iNOS; Inflamação, COX-2,PG,IL</li> <li>• NF-κB, AP-1,MAPK, estimulação de enzimas anti-oxidantes</li> <li>• Inibição de danos no DNA</li> <li>• Mecanismos de reparação DNA</li> </ul>
Proantocianidinas	Semente da uva, nozes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflamação</li> <li>• Inibição H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,iNOS</li> <li>• NF-κB, AP-1,MAPK, estimulação de enzimas anti-oxidantes</li> </ul>

**Tabela 3:** Mecanismos de ação de catequinas e epicatequinas na foto-proteção da pele. Adaptado de (J. A. Nichols, 2010)

## 2.6 Infecção Urinária

As infecções urinárias são usualmente tratadas recorrendo à administração de antibióticos. No entanto, o facto de se recorrer a esta terapêutica com excessiva frequência e muitas vezes sem necessidade, deu origem a um grande problema de saúde pública: o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das bactérias, reduzindo desta forma a eficácia dos antibióticos. (Pallett & Hand, 2010)

A infecção começa quando a bactéria patogénica adere às células uroepiteliais estabelecendo ligações entre as adesinas bacterianas e os recetores presentes na membrana da célula hospedeira. As adesinas uropatogénicas típicas da *E.Coli* são a fimbria do tipo 1, a fimbria P e a adesina X. A fimbria do tipo 1 medeia a aderência e pode ser bloqueada pela D-manose e pelo seu análogo, sendo este mecanismo designado

por sensibilidade de adesão à manose. A ligação entre a fimbria-P e a adesina X não pode ser bloqueada pela manose, pelo que é designada por resistência de adesão à manose. (Liu, Pinzón-Arango, Gallardo-Moreno, & Camesano, 2010)

As proantocianidinas do tipo A apresentam características inibitórias significativas na adesão da *E.Coli* (principal microrganismos causador de infecções urinárias) às células uroepiteliais. (Howell et al., 2010)

A atividade anti-microbiana das proantocianidinas é baseada num conjunto de mecanismos de ação diferentes, pelo que se torna difícil as bactérias conseguirem desenvolver resistências. (Jepson, Williams, & Craig, 2013) As proantocianidinas atuam na prevenção das infecções urinárias, uma vez interferem com a adesão da bactéria às células do trato urinário. (Jepson et al., 2013) O aumento do consumo de frutos ricos em proantocianidinas mostraram o aumento da acidez urinária. (Hisano, Bruschini, Nicodemo, & Srougi, 2012) A resposta anti-adesiva está relacionada com o pH da urina que se manifesta mais ácido após o consumo de proantocianidinas impedindo desta forma que as fimbrias da *E.Coli* adiram aos recetores celulares da bexiga. (Hisano et al., 2012) Posto isto, a bactéria não consegue aderir às células e não causa infeção. A redução das forças de adesão pode estar relacionada com alterações na morfologia bacteriana e/ou genética baseada na diminuição da expressão da fimbria-P. (Liu et al., 2010)

## **Capítulo 4 – Conclusão e Perspetiva Futura**

A idade está associada ao declínio gradual das funções fisiológicas e cognitivas, sendo o maior fator de risco no desencadear de numerosas doenças como a diabetes, o cancro e doenças metabólicas. Penso que o maior desafio para o sistema de saúde prende-se com o facto de encorajar as populações a terem hábitos de vida mais saudáveis o que inclui o consumo de frutas e vegetais e a prática de exercício físico. Neste contexto, insere-se o aumento do consumo de alimentos ricos em proantocianidinas, uma vez que estes compostos reduzem eficazmente o stress oxidativo induzido pelo fator idade e responsável por desencadear uma panóplia de patologias.

Como resposta á questão inicial, a análise da informação obtida, permite-nos afirmar que as proantocianidinas possuem propriedades anti-oxidantes com interesse terapêutico uma vez que reduzem o stress oxidativo e a peroxidação lipídica através da sua capacidade de captar espécies reativas e quelar iões metálicos. As suas propriedades anti-inflamatórias estão associadas á redução de mediadores inflamatórias e moléculas adesivas e inibição da adesão plaquetária. As proantocianidinas são capazes de modificar o citoesqueleto da célula hospedeira, bloqueando a invasão bacteriana, o que lhes confere carácter anti-microbiano. A atividade anti-cancerígena prende-se com a inibição da proliferação de células carcinogénicas e indução da apoptose. Posto isto, a abordagem farmacêutica destes compostos torna-se clara.

No seguimento deste trabalho, penso que poderiam ser feitos novos estudos no sentido de reforçar a ideia de que a ingestão de proantocianidinas pode assumir um papel relevante na prevenção da doença é mais eficaz que a sua administração quando desencadeado o mecanismo fisiopatológico. Ao longo do tempo têm sido feitos vários estudos nesta área no sentido de aprofundar os conhecimentos relativos ás propriedades biológicas das proantocianidinas. Inicialmente estes compostos eram consideradas apenas agentes anti-oxidantes, no entanto desconhecia-se a forma como eram metabolizados e sabia-se muito pouco relativamente ao seu mecanismo de ação. Ao longo dos últimos anos a evolução da ciência permitiu definir com maior clareza os mecanismos de metabolização destes compostos. As investigações realizadas recentemente têm revelado propriedades cada vez mais interessantes associadas às PAs, além de que se tem vindo a verificar que a administração das proantocianidinas em

concomitância com outras terapêuticas poderá trazer enormes vantagens para a saúde, sobretudo quando se trata de terapêuticas agressivas para o organismo, onde se verifica a minimização dos efeitos induzida pelas proantocianidinas.

Penso que a perspectiva futura passa pelo estudo da ação destes compostos em ensaios clínicos mais uniformes de forma a poderem produzir uma maior evidência clínica e pelo estudo de uma veiculação/formulação que aumente a sua biodisponibilidade.

## Bibliografia

- Afanas'ev, I. (2011). ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 293769. doi:10.1155/2011/293769
- Andrade, E. R., Seneda, M. M., & Alfieri, A. A. (2010). Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes, *I*, 79–85.
- Auger, C., Mullen, W., Hara, Y., & Crozier, A. (2008). Bioavailability of polyphenon E flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *The Journal of Nutrition*, 138(8), 1535S–1542S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641203>
- Beecher, G. R. (2003). Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health : Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary Flavonoids : Nomenclature , Occurrence and Intake 1, 3248–3254.
- Bolling, B. W., McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2010). The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(1), 117–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199996>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13659. doi:10.4414/smw.2012.13659
- Byun, E.-B., Sung, N.-Y., Yang, M.-S., Song, D.-S., Byun, E.-H., Kim, J.-K., ... Kim, J.-H. (2014). Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 742–8. doi:10.1089/jmf.2013.2978

- Centenaro, A., Ubirajara, F., Guarienti, C., & Viganó, G. S. (2010). Restrição calórica e ficocianina no processo do envelhecimento de ratos, (I), 80–89. doi:10.5335/rbceh.2010.051
- Cerqueira, F. M., Helena, M., Medeiros, G. De, Bioquímica, D. De, Química, I. De, Paulo, U. D. S., & Sp, S. P. (2007). ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS: CONTROVÉRSIAS E PERSPECTIVAS, *30*(2), 441–449.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *294*, C460–6. doi:10.1152/ajpcell.00211.2007
- Chuang, C.-C., & McIntosh, M. K. (2011). Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual Review of Nutrition*, *31*, 155–76. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145149
- Dennerly, P. A., Sugamura, K., & Keaney, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*, 978–992. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584911003066>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* (pp. 1–539). doi:10.1002/9780470742761
- Dixit, V. D. (2008). Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(4), 882–92. doi:10.1189/jlb.0108028
- Drouin, P., Blickle, J. F., Charbonnel, B., Eschwege, E., Guillausseau, P. J., Plouin, P. F., ... Sauvanet, J. P. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, *33 Suppl 1*, S62–9. doi:10.2337/dc10-S062
- Em, O., Humano, S., Métodos, P., Para, A., Determinação, S. U. A., Nutrição, F. De, ... Al, M. (2007). ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO,

- ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO EM SANGUE HUMANO: PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A SUA DETERMINAÇÃO, *30(5)*, 1323–1338.
- F. Afaq, S. K. K. (2011). Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis, *11(14)*, 1200–1215.
- Ferreira, D., & Coleman, C. M. (2011). Towards the synthesis of proanthocyanidins: half a century of innovation. *Planta Medica*, *77(11)*, 1071–85. doi:10.1055/s-0030-1270908
- Fogarty, M. C., Hughes, C. M., Burke, G., Brown, J. C., Trinick, T. R., Duly, E., ... Davison, G. W. (2011). Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *52*, 35–42. doi:10.1002/em.20572
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, a, Martínez-Augustin, O., & Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51(4)*, 331–62. doi:10.1080/10408390903584094
- Gul, M. Z., Ahmad, F., Kondapi, A. K., Qureshi, I. a, & Ghazi, I. a. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts--an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*, 53. doi:10.1186/1472-6882-13-53
- H. Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, et al. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, *1(1)*.
- Harmidy, K., Tufenkji, N., & Gruenheid, S. (2011). Perturbation of host cell cytoskeleton by cranberry proanthocyanidins and their effect on enteric infections. *PloS One*, *6(11)*, e27267. doi:10.1371/journal.pone.0027267

- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K., & Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, *51*, 993–999. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., & Kihara, Y. (2009). Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*, *73*, 411–418.
- Hisano, M., Bruschini, H., Nicodemo, A., & Srougi, M. (2012). Cranberries and lower urinary tract infection prevention. *Clinics*, *67*, 661–667. doi:10.6061/clinics/2012(06)18
- Howell, A. B., Botto, H., Combescure, C., Blanc-Potard, A.-B., Gausa, L., Matsumoto, T., ... Lavigne, J.-P. (2010). Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infectious Diseases*, *10*, 94. doi:10.1186/1471-2334-10-94
- Hsu, C.-P., Lin, C.-C., Huang, C.-C., Lin, Y.-H., Chou, J.-C., Tsia, Y.-T., ... Chung, Y.-C. (2012). Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal carcinoma by Litchi seed extract. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2012*, 341479. doi:10.1155/2012/341479
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, *62*(1), 1–20. doi:10.1080/01635580903191585
- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., ... Oka, Y. (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*, *118*, 75–83. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745174
- J. A. Nichols, S. K. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms, *302*(2), 1–19. doi:10.1007/s00403-009-1001-3.Skin
- Jaganath, I. B., & Crozier, A. (2010). Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds, 1–50.

- Jepson, R. G., Williams, G., & Craig, J. C. (2013). Cranberries for preventing urinary tract infections. *Sao Paulo Medical Journal*. doi:10.1590/1516-3180.20131315T1
- Johnson, A. R., Milner, J. J., & Makowski, L. (2013). inflammatory traffic in obesity, *249*(1), 218–238. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x.The
- Kanasaki, K., Taduri, G., & Koya, D. (2013). Diabetic nephropathy: The role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Frontiers in Endocrinology*. doi:10.3389/fendo.2013.00007
- Kandaswami, C., Kanadaswami, C., Lee, L.-T., Lee, P.-P. H., Hwang, J.-J., Ke, F.-C., ... Lee, M.-T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo (Athens, Greece)*, *19*(5), 895–909. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184547>
- Kashihara, N., Haruna, Y., Kondeti, V. K., & Kanwar, Y. S. (2010). Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Current Medicinal Chemistry*, *17*, 4256–4269. doi:10.2174/092986710793348581
- Katiyar, S. K. (2008). Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system, *52*(Suppl 1), 1–11. doi:10.1002/mnfr.200700198.Grape
- Katz, D. L., Doughty, K., & Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(10), 2779–811. doi:10.1089/ars.2010.3697
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*, 217–233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Kumar, S., Mishra, A., & Pandey, A. K. (2013). Antioxidant mediated protective effect of Parthenium hysterophorus against oxidative damage using in vitro models. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, *13*. doi:Artn 120rDoi 10.1186/1472-6882-13-120

- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids : An Overview, 2013.
- Kuroda, J., & Sadoshima, J. (2010). NADPH oxidase and cardiac failure. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. doi:10.1007/s12265-010-9184-8
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimiä, R., Westerlund-Wikström, B., Leppänen, T., Welling, J., ... Heinonen, M. (2011). Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European cranberry (*Vaccinium microcarpon*) proanthocyanidins: isolation, identification, and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3373–84. doi:10.1021/jf104621e
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z., & Folco, E. (2010). Inflammation in Atherosclerosis: *Circulation Journal*. doi:10.1253/circj.CJ-09-0706
- Libby, P., & Theroux, P. (2005). Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878
- Liu, Y., Pinzón-Arango, P. A., Gallardo-Moreno, A. M., & Camesano, T. A. (2010). Direct adhesion force measurements between *E. coli* and human uroepithelial cells in cranberry juice cocktail. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1744–1752. doi:10.1002/mnfr.200900535
- M. L. Mateos-Martín, E. Fuguet, C. Quero, J. P.-J., & Torres, J. L. (2012). New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(3), 1327–36. doi:10.1007/s00216-011-5557-3
- Ma, X. Q., Zheng, C. J., Zhang, Y., Hu, C. L., Lin, B., Fu, X. Y., ... Qin, L. P. (2013). Antiosteoporotic flavonoids from *Podocarpium podocarpum*. *Phytochemistry Letters*, 6, 118–122. doi:10.1016/j.phytol.2012.12.004
- Marques, J. F., Marques, D., Silveira, J., & Mata, A. D. (2013). Revisões sistemáticas : O que São e para que Servem, 49, 171–178.

- Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 18, 228–232. doi:S1050-1738(08)00127-8 [pii]n10.1016/j.tcm.2008.11.004
- Mishra, A. K., Mishra, A., Kehri, H. K., Sharma, B., & Pandey, A. K. (2009). Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8, 9. doi:10.1186/1476-0711-8-9
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 963–75. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010
- Monagas, M., Quintanilla-López, J. E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., & Lebrón-Aguilar, R. (2010). MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 358–72. doi:10.1016/j.jpba.2009.03.035
- Nakamura, K., Shirato, M., Ikai, H., Kanno, T., Sasaki, K., Kohno, M., & Niwano, Y. (2013). Photo-irradiation of proanthocyanidin as a new disinfection technique via reactive oxygen species formation. *PloS One*, 8(3), e60053. doi:10.1371/journal.pone.0060053
- Neto, C. C. (2007). Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies. *The Journal of Nutrition*, 137(1 Suppl), 186S–193S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182824>
- Oudit, G. Y., Liu, G. C., Zhong, J., Basu, R., Chow, F. L., Zhou, J., ... Scholey, J. W. (2010). Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 59, 529–538. doi:10.2337/db09-1218
- Pacheco-Palencia, L. a, Mertens-Talcott, S., & Talcott, S. T. (2008). Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4631–6. doi:10.1021/jf800161u

- Pallett, A., & Hand, K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. , 65 Suppl 3 The Journal of antimicrobial chemotherapy iii25–i33 (2010). doi:10.1093/jac/dkq298
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., & Ho, C.-T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 1(1), 15–31. doi:10.1039/c0fo00103a
- Park, J.-S., Park, M.-K., Oh, H.-J., Woo, Y.-J., Lim, M.-A., Lee, J.-H., ... Min, J.-K. (2012). Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. *PloS One*, 7(12), e51377. doi:10.1371/journal.pone.0051377
- Perkins, B. A., Rabbani, N., Weston, A., Ficociello, L. H., Adaikalakoteswari, A., Niewczas, M., ... Thornalley, P. (2012). Serum Levels of Advanced Glycation Endproducts and Other Markers of Protein Damage in Early Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0035655
- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., & Jiang, Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 627–632. doi:10.1016/j.ifset.2009.05.009
- Qaâdan, F., Nahrstedt, A., Schmidt, M., & Mansoor, K. (2010). Polyphenols from Ginkgo biloba. *Scientia Pharmaceutica*, 78(4), 897–907. doi:10.3797/scipharm.1003-19
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. a. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1439–52. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.004
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals , antioxidants , and co-factors, 2(2), 219–236.
- S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, C. G.-V. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679–703. doi:10.3390/ijms11041679

- S.Machado R. Ribeiro, J.Queiroz, M. P. et al. (2005). A FORMAÇÃO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO THE FORMATION AND THE EFFECTS OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES IN, 133–149.
- Scalbert, A., Andres-Lacueva, C., Arita, M., Kroon, P., Manach, C., Urpi-Sarda, M., & Wishart, D. (2011). Databases on food phytochemicals and their health-promoting effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4331–48. doi:10.1021/jf200591d
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208–1216. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.047
- Singh, D. K., Winocour, P., & Farrington, K. (2011). Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7, 176–184. doi:10.1038/nrendo.2010.212
- Tarascou, I., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Souquet, J.-M., Cunningham, D., Nojeim, S., ... Fulcrand, H. (2011). Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC–ESI-MS. *Food Chemistry*, 128(3), 802–810. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.062
- Tateya, S., Kim, F., & Tamori, Y. (2013). Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4(August), 93. doi:10.3389/fendo.2013.00093
- Upadhyay, A. K., Kumar, K., Kumar, A., & Mishra, H. S. (2010). *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. f. and Thoms. (Guduchi) - validation of the Ayurvedic pharmacology through experimental and clinical studies. *International Journal of Ayurveda Research*, 1, 112–121. doi:10.4103/0974-7788.64405
- V. Nandakumar, T. Singh, S. K. K. (2008). Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins, 269(2), 378–387. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.049.Multi-targeted

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Vikrant, A., & Arya, M. L. (2011). A Review on Anti-Inflammatory Plant Barks, 3(2), 899–908.
- Vita, J. A., Holbrook, M., Palmisano, J., Shenouda, S. M., Chung, W. B., Hamburg, N. M., ... Shapira, O. M. (2008). Flow-induced arterial remodeling relates to endothelial function in the human forearm. *Circulation*, 117, 3126–3133. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778472
- Wallace, T. (2010). *Analysis of Procyanidins and Anthocyanidins in Food Product using Chromatographic and Spectroscopic Techniques*.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2010). Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts. *Journal of Food Science*, 75(8), C690–6. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01799.x
- Wang, L., Jiang, Y., Yuan, L., Lu, W., Yang, L., Karim, A., & Luo, K. (2013). Isolation and characterization of cDNAs encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*. *PloS One*, 8(5), e64664. doi:10.1371/journal.pone.0064664
- Woo, H. D., & Kim, J. (2013). Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(7), 1011–9. doi:10.3748/wjg.v19.i7.1011
- Yokozawa, T., Noh, J. S., & Park, C. H. (2012). Green Tea Polyphenols for the Protection against Renal Damage Caused by Oxidative Stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2012, 845917. doi:10.1155/2012/845917
- Yu, J., Zhang, Y., Zhang, X., Rudic, R. D., Bauer, P. M., Altieri, D. C., & Sessa, W. C. (2012). Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-

survivin pathway during Flow-Dependent vascular remodeling. *PLoS ONE*, 7.  
doi:10.1371/journal.pone.0031495



## Anexo I

<b>Actividade das Proantocianidinas</b>	
<b><u>Atividade Anti-Oxidante</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supressão da síntese de ROS/RNS;</li> <li>• Captação de espécies reativas;</li> <li>• Estimulação de enzimas anti-oxidantes;</li> <li>• Iniciação da peroxidase lipídica;</li> <li>• Quelação de iões metálicos;</li> <li>• Diminuição do Stress oxidativo.</li> </ul>
<b><u>Atividade Anti-Inflamatória</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição das proteínas Quinase, NOS, COX e Lipoxigenase;</li> <li>• Ativação de mecanismos imunológicos;</li> <li>• Bloqueio de IL-8;</li> <li>• Diminuição da produção de PG e citocinas pró-inflamatórias;</li> <li>• Inibição da adesão plaquetária;</li> <li>• Regulação das vias PI3K-Akt, MAPK, NF-kB, ERK e MEK.</li> </ul>
<b><u>Atividade Antisséptica</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inativação das adesinas microbianas, enzimas e proteínas transportadoras;</li> <li>• Redução da fluidez da membrana das células bacterianas;</li> <li>• Manipulação da actina do citoesqueleto da célula hospedeira impedindo a invasão bacteriana.</li> </ul>

Tabela 4 – Quadro resumo da atividade das proantocianidinas

## Anexo II

<b>Mecanismos de Ação das Proantocianidinas nas Doenças</b>	
<b><u>Obesidade</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibem as citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas imunológicas através da via MEK/MAPK, TNF-<math>\alpha</math> e AP-1;</li> <li>• Neutralização de ROS/RNS;</li> <li>• Diminuição da atividade oxidase NADPH e NOS.</li> </ul>
<b><u>Diabetes</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da atividade das enzimas anti-oxidantes;</li> <li>• Diminuição AGE.</li> </ul>
<b><u>Infeção Urinária</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição das adesinas uropatogénicas.</li> </ul>
<b><u>Artrite Reumatóide</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supressão da diferenciação de osteoclastos;</li> <li>• Promoção da diferenciação de osteoblastos;</li> <li>• Redução IgG2 específica para o colagénio II e TNF-<math>\alpha</math>.</li> </ul>
<b><u>Cancro</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medeiam a Apoptose;</li> <li>• Captação de moléculas oxidadas;</li> <li>• Interrupção do ciclo celular;</li> <li>• Redução dos níveis de MMP;</li> <li>• Carácter químio-preventivo;</li> <li>• Efeito Foto-protetor e atividade anti-tumoral;</li> <li>• Efeitos anti-metásticos, anti-invasivos e anti-angiogénicos.</li> </ul>
<b><u>Doença Cardiovascular</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição do Stress oxidativo;</li> <li>• Captação de ROS;</li> <li>• Inibição da agregação plaquetária;</li> <li>• Inibição do MMP;</li> <li>• Inibição da oxidação LDL;</li> <li>• Inibição de células adesivas e citocinas pró-inflamatórias;</li> <li>• Inibição da infiltração de macrófagos;</li> <li>• Estimulação de enzimas anti-oxidantes.</li> </ul>

**Tabela 5** - Quadro resumo do mecanismo de ação das proantocianidinas nas doenças