



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**CAROLINE WOELFFEL SILVA**

**EFEITO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NAS ALTERAÇÕES  
MORFOFISIOPATOLÓGICAS COLORRETAL E INFLAMATÓRIAS LOCAL E  
SISTÊMICA, EM MODELO ANIMAL DE CARCINOGENESE**

**ALEGRE – ES**

**Junho 2021**

**CAROLINE WOELFFEL SILVA**

**EFEITO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NAS ALTERAÇÕES MORFOFISIOPATOLÓGICAS COLORRETAL E INFLAMATÓRIAS LOCAL E SISTÊMICA, EM MODELO ANIMAL DE CARCINOGENESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. André Gustavo Vasconcelos Costa  
Coorientador: Prof. Leonardo Oliveira Trivilin  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Pollyanna Ibrahim Silva

ALEGRE – ES  
JUNHO – 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S586e Silva, Caroline Woelffel, 1997-  
Efeito do extrato de café verde (*Coffea canephora*) nas  
alterações morfofisiopatológicas colorretal e inflamatórias local e  
sistêmica, em modelo animal de carcinogênese / Caroline  
Woelffel Silva. - 2021.  
86 f. : il.

Orientador: André Gustavo Vasconcelos Costa.

Coorientadores: Pollyanna Ibrahim Silva, Leonardo Oliveira  
Trivilin.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de  
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Carcinogênese. 2. Imunidade. 3. Café. 4. Antioxidantes.  
5. Cafeína. 6. Intestinos. I. Costa, André Gustavo Vasconcelos.  
II. Silva, Pollyanna Ibrahim. III. Trivilin, Leonardo Oliveira. IV.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

---

**CAROLINE WOELFFEL SILVA**

**"EFEITO DO EXTRATO DE CAFÉ VERDE (*Coffea canephora*) NAS  
ALTERAÇÕES MORFOFISIOPATOLÓGICAS COLORRETAL E  
INFLAMATÓRIAS LOCAL E SISTÊMICA, EM MODELO ANIMAL  
DE CARCINOGENESE"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 18 de junho de 2021.



---

Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa  
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES  
Orientador



---

Prof.ª. Dr.ª. Neuz Maria Brunoro Costa  
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES  
Examinadora Interna



---

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin  
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES  
Examinador Externo



---

Prof.ª. Dr.ª. Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
Universidade Federal de Viçosa-UFV  
Examinadora Externa

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas conquistas até o momento, por tudo o que tem surgido na minha caminhada, e até mesmo pelos obstáculos porque eles me ensinaram as maiores lições.

A minha família, por sempre me apoiar mesmo sem entender, neste caso, a decisão de morar fora de casa. Mãe, por todos os dias e noites no laboratório em meio a pandemia, tornando tudo mais leve para mim e para quem estava conosco. Pai, por sempre acreditar em mim e fazer o impossível para me ver feliz. Ao meu irmão, que me honra por me considerar um exemplo.

Ao Gabriel, por todo amor, apoio e companheirismo nessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. André, por tanta paciência, compreensão e ensinamentos. Por me orientar não somente na área acadêmica, mas pela orientação para superar todos os momentos complicados que passei. Eu não poderia ter tido um orientador melhor do que você foi/é. Toda a minha gratidão!

Ao meu Coorientador, Prof. Leonardo, que fazia dos dias teoricamente exaustivos os melhores dentro do laboratório, que desperta em mim pensamentos curiosos, que me ensina a cada dia sobre estudos, mas principalmente sobre a vida.

As professoras Neuza e Mirella, por tanta disponibilidade para ajudar e ensinar e fazer o nosso grupo de pesquisas enriquecedor. Além de sempre ter palavras de carinho e conforto, com tudo que eu e minha família passamos.

A Prof.<sup>a</sup> Pollyanna, sempre disponível para me ajudar e orientar nas aulas práticas que foram incentivadoras para mim.

A Prof.<sup>a</sup> Maria do Carmo Gouveia Peluzio por aceitar participar dessa banca.

A Keila, companheira de pesquisa, por toda colaboração dentro e fora do laboratório. Conte comigo sempre!

As amigas do mestrado, em especial Barbara e Manu, por tornar todas a novidade, agito e medo do mestrado imensamente mais leve. Manu, a maior motivadora e apoiadora do meu mestrado em Alegre. Barbara, a minha companheira de todo dia e toda hora, meu verdadeiro porto seguro em Alegre.

As meninas do meu eterno laboratório 30, Camile, Mayara, Karla, Leandra, Patrícia e Nathacha, onde eu descobri o que queria para vida e sempre sou recebida com muito carinho.

Aos técnicos dos laboratórios, Eduardo, Anderson, Júlio, Mayara, Maurício e Letícia, sempre disponíveis e dispostos a ajudar.

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PCTA), pela oportunidade de desenvolver o estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento do estudo (Projeto PRONEX - CNPq/FAPES, Edital 24/2018 – TO 567/2018; Edital FAPES Universal, nº 21/2018; Edital Fapes 16/2018 – TO 139/2020).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), o presente trabalho foi realizado com apoio desta - Código de Financiamento 001.

A todos que de perto ou de longe, direta ou indiretamente, fizeram parte desta etapa.

Muito obrigada!

## LISTA DE SIGLAS

% - Porcentagem  
°C - Graus Celsius  
® - Marca Registrada  
 $\alpha$  - Alfa  
 $\beta$  - Beta  
 $\mu\text{L}$  - Microlitro  
ABTS - radical 2,2'-Azino-bis  
AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC - Association of Official Analytical Chemists  
BCL-2 - B-Cell Lymphoma 2  
CAT - Catalase  
CCR - Câncer Colorretal  
CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar  
CEC - Coeficiente de Eficiência Calórica  
CGA – ácido clorogênico  
COX-2 – cicloxigenase 2  
DMH - Dimetilhidrazina  
DNA - Ácido Dextribonucléico  
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
EGF - Fator de Crescimento Epidermal  
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio  
ES - Espírito Santo  
EUA - Estados Unidos da América  
FCA - Focos de Criptas Aberrantes  
FFARs - Receptores de Ácidos Graxos Livres  
g - Grama  
GSH-Px - Glutathiona Peroxidase  
HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer  
IgA - Imunoglobulina A  
IL- Interleucina  
kg - kilograma

MDA - Malondialdeído

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mM - Milimolar

mmol - Milimol

ng – Nanograma

NRF-2 -Fator Nuclear Eritroide 2

NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear kappa B

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNA - Ácido Ribonucléico

sIgA - Imunoglobulina A secretória

SP - São Paulo

SOD - Superóxido Dismutase

T-AOC - Capacidade Antioxidante Total

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRL4 - receptor do tipo Toll 4

UFES - Universidade federal do Espírito Santo

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico no café verde e torrado.....	19
<b>Tabela 2</b> – Estudos com café verde ou seus compostos majoritários e seus efeitos no câncer colorretal.....	23
<b>Tabela 1</b> – Composição das dietas experimentais com base na AIN-93 M.....	39
<b>Tabela 2</b> – Quantificação de compostos majoritários do extrato de café verde e a capacidade antioxidante.....	43
<b>Tabela 3</b> – Alterações intestinais neoplásicas e de crescimento na 15ª semana de experimento.....	50

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estágios do câncer colorretal.....10
- Figura 1** – Esquema do desenho experimental. T: semana; CCR: câncer colorretal; C: grupo controle negativo (sem indução de CCR, dieta AIN93 M); T: grupo controle positivo (com indução de CCR, dieta AIN93 M); CCV: sem indução de CCR, dieta AIN93 M + extrato de café verde; TCV: com indução de CCR + dieta AIN93 M + extrato de café verde.....38
- Figura 2** – Preparo histológico para contagem de FCA. Intestino grosso aberto longitudinalmente e preparação para fixar (A), Alterações macroscópicas laminadas (B).....41
- Figura 3** – Ganho de peso dos animais durante per. Ganho de peso até a 5° semana (n=48) (A), ganho de peso até a 10° semana (n=16) (B), ganho de peso até a 15° semana (n=32) (C), evolução do peso semanalmente (D).....44
- Figura 4** – Gráficos de consumo alimentar. Consumo per capita diário (A), consumo diário de ácido clorogênico (B), consumo diário de cafeína (C), consumo diário de trigonelina (D).....45
- Figura 5** – Gráficos de kcal per capita, coeficiente de eficiência alimentar e calórica da 10° semana de experimento. Kcal per capita diário até a 10° semana (A), coeficiente de eficiência alimentar até a 10° semana (CEA) (B) e coeficiente de eficiência calórica até a 10° semana (CEC) (C).....46
- Figura 6** – Gráficos de kcal per capita, coeficiente de eficiência alimentar e calórica da 15° semana de experimento. Kcal per capita diário até a 15° semana (A), coeficiente de eficiência alimentar até a 15° semana (CEA) (B) e coeficiente de eficiência calórica (CEC) (C).....47
- Figura 7** – Gráficos da contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) realizada em intestino grosso de ratos Wistar na 10° semana de experimento. Contagem de focos de criptas aberrantes com menos de 3 criptas (A), contagem de focos de criptas aberrantes com mais de 3 criptas (B). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste t.....48
- Figura 8** – Fotomicrografias da mucosa intestinal de ratos submetidos à carcinogênese colorretal. A: Aparência de intestino saudável. B: Área de intestino de animais do grupo T

(grupo com indução de câncer, sem extrato de café verde) com focos com < 3 criptas aberrantes (1) e focos com > 3 criptas aberrantes (2). C: Área de intestino de animais do grupo TCV (grupo com indução de câncer e com extrato de café verde) contendo focos com < 3 criptas aberrantes (1) e focos com > 3 criptas aberrantes (2). (Aumento: 4x. Corante: azul de metileno).....49

**Figura 9** – Aparência das lesões macroscópicas em intestino de ratos Wistar induzidos à carcinogênese colorretal após período de ingestão com extrato aquoso de café verde. A: Intestino grosso animal do grupo T (com indução do câncer e sem extrato de café verde) com 6 lesões macroscópicas (A= hiperplasia; B= adenocarcinoma tubular colorretal; C= carcinoma in situ; D= adenoma; E= displasia; F= displasia). B: Intestino grosso animal do grupo TCV (com indução do câncer e com extrato de café verde) com 1 lesão (A= adenocarcinoma tubular colorretal).....50

**Figura 10** – Concentração de manitol e lactulose na urina de 24 horas e a relação lactulose/manitol da 10<sup>o</sup> semana. Excreção de manitol da 10<sup>o</sup> semana (A), Excreção de lactulose da 10<sup>o</sup> semana (B), relação lactulose/manitol da 10<sup>o</sup> semana (C). Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....51

**Figura 11** – Concentração de manitol e lactulose na urina de 24 horas e a relação lactulose/manitol da 15<sup>a</sup> semana. Excreção de manitol da 15<sup>a</sup> semana (A), Excreção de lactulose da 15<sup>a</sup> semana (B), relação lactulose/manitol da 15<sup>a</sup> semana (C). Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....52

**Figura 12** – Valores de pH intestinal de ratos Wistar na 10<sup>a</sup> semana (n=4).....53

**Figura 13** – Valores de pH intestinal de ratos Wistar na 15<sup>a</sup> semana (n=8). Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....53

**Figura 14** – Concentração de IgA secretora (pg/mL) no conteúdo cecal de ratos Wistar na 15<sup>a</sup> semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....54

**Figura 15** – Concentração (pg/mL) de IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12 (C) e TNF- $\alpha$  (D) sanguíneos de ratos Wistar na 15<sup>a</sup> semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....55

**Figura 16** – Determinação da capacidade antioxidante total ( $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox) em amostras sanguíneas de animais na 15ª semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....56

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Referências bibliográficas.....	3
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
3.1 Introdução.....	7
3.2 Câncer colorretal.....	9
3.3 Compostos bioativos do café verde.....	16
3.4 Café verde e efeitos na saúde .....	20
3.5 Efeitos do café verde no câncer colorretal.....	21
3.6 Conclusão.....	24
3.7 Referencias.....	25
<b>4. ARTIGO ORIGINAL</b> .....	32
4.1 Introdução .....	33
4.2 Materiais e métodos.....	34
4.3 Resultados.....	43
4.4 Discussão.....	56
4.5 Conclusão.....	63
4.6 Referencias bibliográficas.....	63
<b>5. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	69

## RESUMO

SILVA, Caroline Woelffel. **Efeito do extrato de café verde (*Coffea canephora*) nas alterações locais e sistêmicas, em modelo animal de carcinogênese colorretal.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa. Coorientador(es): Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivillin e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pollyanna Ibrahim Silva.

O câncer colorretal (CCR) é a quarta neoplasia maligna mais comumente diagnosticada no mundo. O processo inflamatório e o estresse oxidativo são mecanismos envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde em modelo in vivo de carcinogênese colorretal, por meio das alterações morfofisiopatológicas da mucosa colorretal e inflamatórias sistêmicas. Quarenta e oito ratos Wistar adultos foram divididos em quatro grupos (n=12): C (controle saudável alimentado com dieta AIN-93 M), T (induzidos ao CCR e alimentados com dieta AIN-93 M), CCV (controle saudável alimentado com dieta AIN-93 M + extrato de café verde), TCV (induzidos ao CCR e alimentados com dieta AIN-93 M + extrato de café verde). A carcinogênese foi induzida nos grupos T e TCV, com 1,2-dimetilhidrazina (55 mg/kg, via subcutânea, semanalmente), durante cinco semanas. Durante a indução, todos os grupos receberam dieta padrão AIN-93 M. Da 6<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semana, os grupos experimentais foram alimentados com suas respectivas dietas. Ao final da 10<sup>a</sup> semana, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados para coleta de dados referentes ao período pré-neoplásico. Os animais restantes (n=8/grupo) permaneceram no estudo até o final da 15<sup>a</sup> semana, na qual realizou-se análise da permeabilidade intestinal por meio da coleta da urina de 24h após administração de lactulose (100 mg/kg) e manitol (50 mg/kg). Em seguida, os animais foram eutanasiados e coletados sangue para análise do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e capacidade antioxidante total (CAT). O conteúdo do intestino grosso foi utilizado para análise do pH intraluminal, imunoglobulina A secretória (sIgA), e o tecido colorretal para avaliação das lesões macro e microscópicas da mucosa. O extrato de café verde e a indução do câncer não foram capazes de alterar o consumo, ganho de peso e coeficientes de eficiência alimentar e calórica. O pH intestinal foi significativamente maior no grupo CCV em comparação com o TCV. A permeabilidade intestinal encontrou-se aumentada no grupo T. O grupo TCV apresentou a maior contagem de FCA, sendo 51,1% maior em relação ao grupo T. A redução das alterações neoplásicas malignas foi de 42,84% e das benignas foi de 66,67% do grupo T para o grupo TCV, já em relação as alterações de crescimento houve redução de 33,33% e 20% das hiperplasias e displasias, respectivamente. Não se observou diferença significativa na quantificação de IgA entre os grupos experimentais. E tanto TCV quanto T mostraram valores elevados da capacidade antioxidante total sanguínea. Conclui-se que o extrato aquoso do café verde foi benéfico para a permeabilidade intestinal e controlou o desenvolvimento de neoplasmas em mucosa colorretal, sem interferência na inflamação sistêmica, com 10 semanas de ingestão diária, reforçando que o café verde diminui o risco de desenvolvimento da carcinogênese colorretal.

**Palavras-chave:** carcinogênese experimental, imunidade, permeabilidade intestinal, antioxidantes, café verde.

## ABSTRACT

SILVA, Caroline Woelffel. **Effects of green coffee extract (*Coffea canephora*) on local and systemic changes, in an animal model of colorectal carcinogenesis.** 2021. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) - Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa. Co-advisor: Prof. Dsc. Leonardo Oliveira Trivillin and Prof. Dsc. Pollyanna Ibrahim Silva.

Colorectal cancer (CCR) is the fourth most commonly diagnosed malignancy in the world. The inflammatory process and oxidative stress are responsible for the development of carcinogenesis. Thus, the objective was to evaluate the effect of the aqueous extract of green coffee in an *in vivo* model of colorectal carcinogenesis, through the morphophysiological changes of the colorectal mucosa and systemic inflammatory conditions. Forty-eight adult Wistar rats were divided into four groups (n = 12): C (healthy control fed AIN-93 M diet), T (CCR induced and fed AIN-93 M diet), CCV (healthy control fed with diet AIN-93 M + green coffee extract), TCV (induced to CCR and fed diet AIN-93 M + green coffee extract). Carcinogenesis was induced in the T and TCV groups with 1,2-dimethylhydrazine (55 mg/kg, seen subcutaneously, weekly) for five weeks. During induction, all groups received standard AIN-93 M diet. From week 6 to 15, experimental groups were fed their respective diets. At the end of the 10th week, four animals from each group were euthanized for data collection regarding the pre-neoplastic period. The remaining animals (n = 8 / group) stayed in the study until the end of the 15th week, in which an analysis of intestinal permeability was performed through 24-hour urine collection after administration of lactulose (100 mg / kg) and mannitol ( 50 mg/kg). Afterwards, the animals were euthanized and blood collected to analyze the profile of pro and anti-inflammatory cytokines and total antioxidant capacity (TAC). The contents of the large intestine were used for analysis of intraluminal pH, secretory immunoglobulin A (sIgA), and colorectal tissue for evaluation of macro and microscopic evaluations of the mucosa. Green coffee extract and cancer induction were not able to alter consumption, weight gain, and food and caloric efficiency coefficients. Intestinal pH was significantly higher in the CCV group compared to the TCV. Intestinal permeability was increased in the T group. The TCV group had the highest FCA count, being 51.1% higher compared to the T group. 66.67% from group T to group TCV, in relation to changes in growth there was a reduction of 33.33% and 20% of hyperplasia and dysplasia, respectively. There was no significant difference in the quantification of IgA between the experimental groups. And both TCV and T showed high values of total blood antioxidant capacity. It is concluded that the aqueous extract of green coffee was beneficial for intestinal permeability and controlled the development of neoplasms in the colorectal mucosa, without interfering with systemic inflammation, with 10 weeks of daily intake, reinforcing that green coffee reduces the risk of developing the colorectal carcinogenesis.

**Keywords:** experimental carcinogenesis, immunity, intestinal permeability, antioxidants, green coffee.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e uma crescente causa de morte por câncer no mundo, em 2018 foram diagnosticados 1,93 milhões de novos casos de CCR (WHO, 2021b). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), são estimados aproximadamente 2,13 milhões de novos casos de câncer colorretal entre os anos 2020 e 2025 (WHO, 2021b).

O CCR é uma doença multifatorial, sendo produto de alterações genéticas e epigenéticas, além do consumo excessivo de carne processada, alimentação pobre em frutas, vegetais e outros alimentos que contenham fibras (GRANCIERI et al., 2017; SKRZYDLEWSKA et al., 2001).

As causas acima citadas promovem o desenvolvimento de lesões precursoras do CCR, iniciando o processo de carcinogênese (DALAL et al., 2020). Não obstante, outras alterações em âmbito intestinal também podem ocorrer, como o aumento da permeabilidade intestinal, que está diretamente ligada à carga tumoral (WU, Yan Yan et al., 2018). Além disso, o CCR também leva à redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta (YUSUF et al., 2019; ZHANG, Hong et al., 2019), os quais são capazes de induzir a apoptose e limitar a proliferação de células específicas do câncer (HINNEBUSCH et al., 2002; TIAN, Yun et al., 2018).

O estresse oxidativo também está relacionado com o desenvolvimento de câncer colorretal, em que os radicais livres contribuem para carcinogênese em todos os estágios: iniciação, promoção e progressão. Esses no microambiente intestinal, podem estimular as células inflamatórias a respostas inflamatórias crônicas, além de danificar o DNA em células produzindo mutações, os quais são fatores que podem levar à ocorrência de CCR (SI et al., 2021; SKRZYDLEWSKA et al., 2001).

O entendimento sobre a associação entre dieta e saúde vem aumentando nos últimos anos, utilizando-se de intervenções dietéticas e suplementação de compostos bioativos naturais para avaliar a redução do risco de doenças gastrointestinais, como o câncer colorretal (AACHARY et al., 2015; REIS; DA CONCEIÇÃO; PELUZIO, 2019). Esses compostos, entre os quais destacam-se os compostos fenólicos, são encontrados em alimentos de origem vegetal, como



o café (MOREIRA-ARAÚJO et al., 2017).

O café possui duas espécies de maior importância econômica, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, chamadas também de café arábica e café conilon, respectivamente (INCAPER, 2019). Além das vantagens em relação a plantio e resistência a temperatura, o café conilon difere do café arábica quanto ao teor de compostos antioxidantes, ácido clorogênico e cafeína; enquanto o arábica apresenta maior teor de açúcares totais, indicando a superioridade sensorial desta variedade (AGNOLETTI et al., 2019).

Outros importantes componentes do café como a trigonelina e a cafeína, pois além da propriedade estimulante, a sua ingestão tem sido associada com efeitos antioxidantes benéficos por diminuir os níveis de biomarcadores do estresse oxidativo (KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019). Entretanto, a cafeína está presente em maior quantidade no café torrado, visto que o processo de torra do grão de café é capaz de degradar outros compostos importantes como o ácido clorogênico e a trigonelina, o que justifica a utilização do café verde, ou café maduro não torrado, por este apresentar maior teor desses compostos e consequentemente maior capacidade antioxidante (OESTREICH-JANZEN, 2010).

Ressalta-se que no café verde, o ácido clorogênico apresenta-se como composto fenólico majoritário, com atividade anticarcinogênica em células e modelo animal de câncer colorretal (MOJICA et al., 2018; SHIN et al., 2015). Ainda, o extrato de café verde, apresenta potente ação antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, anti-hipertensivo, antiobesidade e estimulador do sistema nervoso central (DESAI et al., 2020; KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019; NAVEED et al., 2018). Além disso, foi associado beneficemente também a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (GOUTHAMCHANDRA et al., 2017; SILVA FARIA et al., 2020).

Justifica-se a intervenção dietética com extrato de café verde, pela sua capacidade antioxidante proveniente de compostos bioativos como o ácido clorogênico, a cafeína e a trigonelina, como uma proposta para a redução dos riscos de desenvolvimento do câncer colorretal.

## 1.1 Referências bibliográficas

AACHARY, Ayyappan A. et al. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 2, p. 146–152, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.004>>.

AGNOLETTI, Bárbara Z. et al. Discrimination of Arabica and conilon coffee from physicochemical properties allied to chemometrics. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 785–805, 2019.

DALAL, Nishu et al. Omics technologies for improved diagnosis and treatment of colorectal cancer: Technical advancement and major perspectives. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 131, n. August, p. 110648, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110648>>.

DESAI, Nivas M. et al. Non-digestible oligosaccharides of green coffee spent and their prebiotic efficiency. **Lwt**, v. 118, n. October, 2020.

GOUTHAMCHANDRA, K. et al. Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 147–153, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>>.

GRANCIERI, Mariana et al. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666–675, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.039>>.

HINNEBUSCH, Brian F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 1012–1017, 2002.

KACZMARCZYK-SEDLAK, Ilona et al. Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Archives of Medical Science**, v. 15, n. 4, p. 1073–1080, 2019.

MOJICA, Benigno E. et al. The Impact of the Roast Levels of Coffee Extracts on their Potential Anticancer Activities. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1125–1130, 2018.

MOREIRA-ARAÚJO, Regilda Saraiva dos Reis et al. Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 5, p. 799–805, 2017.

NAVEED, Muhammad et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 67–74, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>>.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of Coffee. **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**, v. 3, p. 1085–1117, 2010.

REIS, Sandra Aparecida Dos; DA CONCEIÇÃO, Lisiane Lopes; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia. Intestinal microbiota and colorectal cancer: changes in the intestinal microenvironment and their relation to the disease. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1391–1407, 2019.

SHIN, Hee Soon et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. **Food Chemistry**, v. 168, p. 167–175, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.100>>.

SI, Huifang et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora. **Seminars in Cancer Biology**, v. 70, p. 3–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.004>>.

SILVA FARIA, Wanessa Costa et al. Antioxidant efficacy and in silico toxicity prediction of free and spray-dried extracts of green Arabica and Robusta coffee fruits and their application in edible oil. **Food Hydrocolloids**, v. 108, n. May, 2020.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 64, n. 3, p. 213–222, 2001.

TIAN, Yun et al. Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 57, p. 103–109, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.007>>.

WHO, World Health Organization. **Estimated number of new cases from 2020 to 2025**. Disponível em: <[https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=9\\_8&single\\_unit=50000&group\\_p\\_cancers=1&multiple\\_cancers=1&populations=903\\_904\\_905\\_908\\_909\\_935&group\\_populations=1&multiple\\_populations=1&years=2025](https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=9_8&single_unit=50000&group_p_cancers=1&multiple_cancers=1&populations=903_904_905_908_909_935&group_populations=1&multiple_populations=1&years=2025)>.

WU, Yan Yan et al. Effects of berberine on tumor growth and intestinal permeability in HCT116 tumor-bearing mice using polyamines as targets. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 1447–1453, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.130>>.

YUSUF, F. et al. Altered profile of gut microbiota and the level short chain fatty acids in colorectal cancer patients. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1146, n. 1, p. 0–6, 2019.

ZHANG, Hong et al. Altered intestinal microbiota associated with colorectal cancer. **Frontiers of Medicine**, v. 13, n. 4, p. 461–470, 2019.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do extrato de café verde no câncer colorretal, por meio das alterações morfofisiopatológicas locais e inflamatórias sistêmicas, em modelo animal de carcinogênese colorretal.

### **2.2 Objetivos específicos**

Determinar o teor de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina em extratos de café verde;

Avaliar a atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos totais no extrato de café verde.

Avaliar o efeito do extrato de café verde na carcinogênese colorretal, por meio das alterações morfofisiopatológicas da mucosa intestinal dos animais.

Avaliar o ganho de peso e consumo alimentar dos animais.

Avaliar o efeito do extrato de café verde sobre o pH e conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta do fluido intestinal dos animais com ou sem câncer colorretal induzido.

Analisar o efeito do extrato de café verde sobre a integridade da barreira intestinal de animais submetidos ou não à carcinogênese colorretal.

Verificar a atuação do extrato de café verde na concentração de IgA secretora intestinal.

Avaliar o efeito do extrato de café verde sobre as respostas inflamatória e oxidativa sistêmicas de animais submetidos ou não à carcinogênese colorretal.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **Compostos bioativos do café verde como agentes na redução do risco de câncer colorretal**

##### **RESUMO**

O desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) envolve uma série de alterações patológicas, porém a condição inflamatória da mucosa intestinal, o aumento do estresse oxidativo e alterações intestinais locais auxiliam para a progressão dessa neoplasia. Estudos com o café verde apontam seus efeitos anticarcinogênicos promovidos por diminuição dos danos ao DNA por combate aos radicais livres, manutenção da integridade intestinal e efeito antiproliferativos em células cancerosas. A presente revisão bibliográfica objetivou relacionar o café verde e seus compostos bioativos com o desenvolvimento e progressão do câncer colorretal. Intervenções nutricionais para mudanças dos hábitos alimentares tem um papel importante na redução do risco de desenvolvimento de câncer, como o café verde, um alimento rico em antioxidantes como ácido clorogênico, cafeína e trigonelina. Estudos utilizando tanto células quanto modelo animal relacionando tanto com o extrato de café verde quanto com seus compostos bioativos apontam efeitos benéficos que reduzem o risco de desenvolvimento do CCR, como a melhora da inflamação e integridade intestinal, modulação de citocinas, alívio do estresse oxidativo e efeito antiproliferativo de células. Concluindo, os estudos apresentados são importantes e promissores na busca de formas de tratamento e prevenção do câncer colorretal, indicando relação positiva entre o café verde e seus compostos bioativos com a diminuição do risco de desenvolver o CCR.

### 3.1 Introdução

O CCR é uma das neoplasias mais comumente diagnosticada e sua taxa de mortalidade tem aumentado. A mais recente estimativa mundial, realizada em 2018, aponta que 18 milhões de novos casos de câncer ocorreram e 9,6 milhões de óbitos, já para o Brasil a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio de 2020-2022 é de 20.520 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres (INCA, 2021).

Entre os principais fatores de risco para o CCR incluem-se a idade, excesso de peso corporal, consumo excessivo de carne processada e alimentação pobre em frutas, vegetais e outros alimentos que contenham fibras (WU, Rong et al., 2017; ZHANG, Hong et al., 2019).

O desenvolvimento do CCR envolve uma série de alterações patológicas, na qual a condição inflamatória crônica está associada a pelo menos 25% dos casos de câncer colorretal (NIEDERREITER; ADOLPH; TILG, 2018), tanto na fase de iniciação, quanto progressão e metástase. Na progressão da lesão neoplásica, as citocinas inflamatórias promovem a proliferação celular e induzem o recrutamento e diferenciação de células inflamatórias na região afetada, podendo causar aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (MURATA, 2018; ZHANG, Xinwen et al., 2017). Além disso, um microambiente imunológico especial induz reações imunológicas anormais no tecido colorretal enfraquece a barreira intestinal, causa proliferação celular, EROs e outros radicais danificando o DNA de células induzindo mutações, todos esses mecanismos trabalham juntos para promover o desenvolvimento de tumores colorretais (SI et al., 2020).

O aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) leva ao estresse oxidativo, que é caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas e redução de substâncias antioxidantes endógenas, sendo um dos mecanismos relacionados à carcinogênese. O estresse oxidativo está associado a alterações como a peroxidação de ácidos graxos, que levam às mutações celulares, e a danos no DNA, provenientes do desequilíbrio entre radicais livres, atividade antioxidante e mecanismos de reparação do DNA (OLIVEIRA et al., 2006; WU, Rong et al., 2017).

Os antioxidantes são substâncias que tem a capacidade de retardar e inibir oxidação, conseqüentemente melhorar os danos causados pelos radicais livres

e assim reduzir o risco do surgimento de doenças. Esses antioxidantes são encontrados, principalmente, em alimentos de origem vegetal, na forma de vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que são importantes tanto na diminuição do estresse oxidativo quanto na redução do risco de desenvolvimento de câncer, podendo fazer parte da alimentação humana através de intervenções nutricionais que visam mudanças de hábitos alimentares (GOUTHAMCHANDRA et al., 2017; JESZKA-SKOWRON; STANISZ; DE PEÑA, 2016; WISEMAN, 2019). E estudos com café, rico em compostos antioxidantes e uma das bebidas mais consumidas no mundo, sugerem que o hábito de consumir café está relacionado com padrões saudáveis e pode promover redução de 13% do risco de câncer, além de efeito benéfico em outras doenças crônicas não transmissíveis como diabetes e doenças cardiovasculares (GOUTHAMCHANDRA et al., 2017; ROMUALDO et al., 2019). Porém, é no café verde que se encontra a maior concentração de compostos bioativos que estão relacionados com a redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis (LE MOS et al., 2020; ROMUALDO et al., 2019). Essa diferença nos teores acontece porque o processo de torra degrada o ácido clorogênico em isômeros e a trigonelina em piridinas e pirrol, devido à instabilidade térmica de ambos (ACIDRI et al., 2020; FARAH; DONANGELO, 2006).

Alguns componentes do café apresentam importância como o ácido clorogênico, a trigonelina e a cafeína, que além da propriedade estimulante a sua ingestão tem sido associada com efeitos antioxidantes benéficos por diminuir os níveis de biomarcadores do estresse oxidativo (KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019).

Segundo Castro et al. (2017), os compostos fenólicos presentes no café verde (grãos maduros não torrados) se destacam dentre os seus compostos bioativos por sua atividade antioxidante, sendo os ácidos clorogênicos a principal classe. Alguns estudos com café verde apontaram seus efeitos anticarcinogênicos, como a capacidade de inibir o câncer colorretal, além de efeitos benéficos relacionados a resistência à insulina (BAEZA et al., 2014; CASTRO et al., 2018; GOUTHAMCHANDRA et al., 2017).

Levando em consideração que os danos causados pelo estresse oxidativo podem levar ao processo inflamatório e a alterações patológicas, aumentando o risco de desenvolvimento da carcinogênese colorretal ou agravando a condição

pré-existente, justifica-se a utilização do extrato de café verde, como uma fonte de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, na intenção de inibir a ação de radicais livres e auxiliar na diminuição da gravidade do câncer colorretal. Portanto, essa revisão tem como objetivo relacionar o café verde e seus principais compostos ativos com o desenvolvimento e progressão do câncer colorretal.

### **3.2 Câncer colorretal**

O câncer colorretal (CCR) é uma das principais causas de morte relacionada ao câncer (HAJIZADEH et al., 2020). O curso natural desta doença pode ser alterado com intervenções no estilo de vida, visto que o câncer colorretal se desenvolve a partir de um pólipó, que é uma lesão precursora. A presença dessas lesões levam ao desenvolvimento de pólipos adicionais, aumentando ainda mais o risco de desenvolver CCR (LITTLE et al., 2017).

O processo da carcinogênese no CCR é complexo e estão envolvidos elementos ambientais e genéticos. O microambiente tumoral proporciona fatores promotores que estão envolvidos no início, promoção e progressão do câncer colorretal, através da contribuição para o desenvolvimento e sobrevivência das células malignas, suprimir o sistema imunológico, a angiogênese, metástase e alterar a resposta a quimioterápicos (BUŁDAK et al., 2018; HAJIZADEH et al., 2020).

São escassos os estudos que investigaram a relação entre dieta e recorrência de CCR, porém o conceito de influência da dieta no risco de câncer colorretal não é recente. A alimentação pode exercer seus efeitos benéficos à saúde, como efeitos anticancerígenos por meio da modulação das vias inflamatórias envolvidas na iniciação e progressão da carcinogênese colorretal, bem como efeitos antioxidantes provenientes de compostos fenólicos, por exemplo, como agentes potenciais na modificação da inflamação no câncer colorretal em estágio inicial (LITTLE et al., 2017).

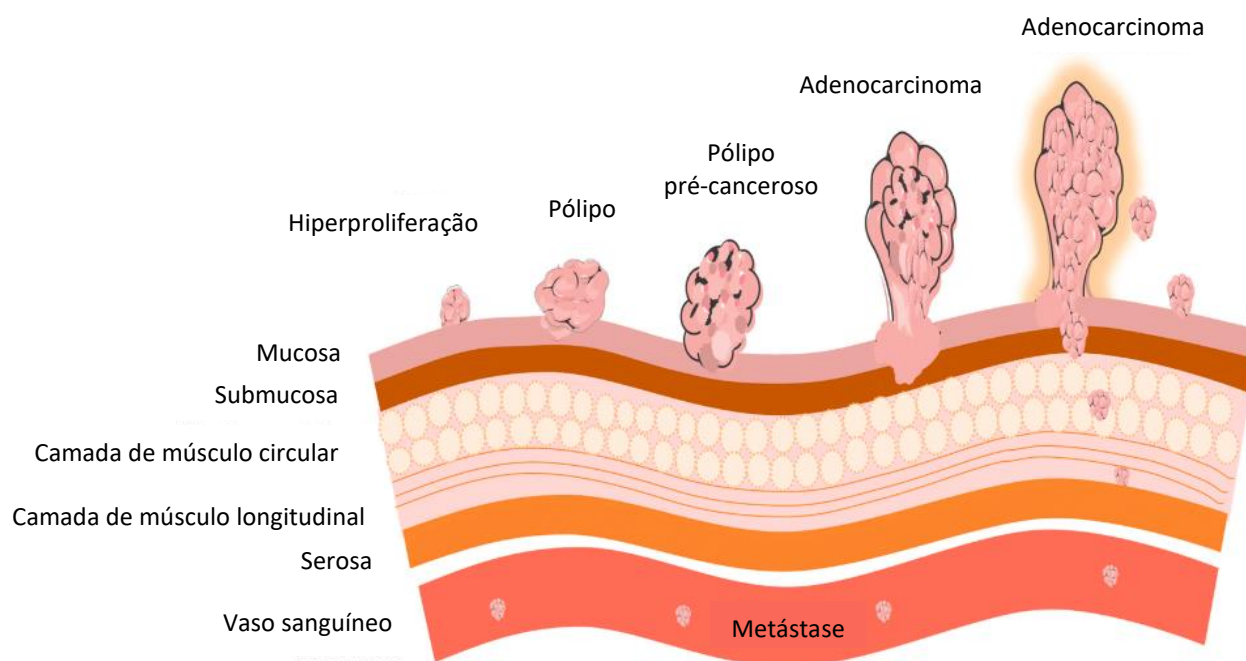
O câncer colorretal engloba tanto cólon quanto as partes retais do intestino grosso. Além de fatores já discutidos, as mudanças genéticas e epigenéticas são capazes de provocar a conversão de células epiteliais intestinais normais em células de carcinoma (DALAL et al., 2020).



Muitos aspectos do câncer colorretal são importantes para a explicação da carcinogênese e possíveis terapias, como vias de sinalização que ordenam a progressão do câncer, identificação de biomarcadores para detecção precoce e resposta ao tratamento (GOPČEVIĆ et al., 2013).

A mutação genética é uma causa comum de CCR genético e as alterações epigenéticas cooperam na condução do pólipo à progressão do câncer. Os extremos da metilação do DNA são capazes de inativar o gene supressor da lesão neoplásica, no caso da hipermetilação, ou ativar a oncogene, no caso da hipometilação (DALAL et al., 2020). Essas alterações levam ao crescimento descontrolado de células epiteliais, induzindo à carcinogênese.

A Figura 1 esquematiza os estágios do câncer colorretal, onde essa hiperproliferação das células forma um crescimento no revestimento interno do cólon ou reto, chamado de pólipo, que pode aumentar de tamanho e invadir a camada mais externa, levando a formação de um adenocarcinoma, que adquire potencial metastático e propaga o câncer através da circulação sanguínea.



**Figura 1** – Estágios do câncer colorretal.

**Fonte:** Adaptado de Dalal et al., (2020).

A progressão do pólipo depende de sinais de crescimento e sobrevivência do microambiente tumoral (LITTLE et al., 2017). O desenvolvimento do câncer

também vai depender desses sinais, além disso envolve uma série de alterações patológicas, desde lesões microscópicas na mucosa, como focos de criptas aberrantes (FCA), até tumores malignos. (HURLSTONE; CROSS, 2005; RODRIGUES et al., 2002). Os focos de cripta aberrantes são reconhecidos como lesões precoce e precursora do CCR, caracterizada pela criptas colônicas anormalmente alargadas, juntamente de espessamento epitelial e eventual displasia (HURLSTONE; CROSS, 2005). Sua contagem é utilizada como biomarcador para a detecção de fator de risco e proteção do câncer colorretal, sendo consideradas indicadores iniciais do câncer colorretal (DOS REIS, S. O. et al., 2019; RODRIGUES et al., 2002).

### **3.2.1 Alterações sistêmicas no CCR**

#### **3.2.1.1 Biomarcadores inflamatórios**

Além das alterações para iniciação do processo de carcinogênese do CCR já comentados, uma condição inflamatória crônica está associada a pelo menos 25% dos casos de câncer colorretal (NIEDERREITER; ADOLPH; TILG, 2018), tanto na fase de iniciação, quanto progressão e metástase. Na progressão da carcinogênese as citocinas inflamatórias além de promoverem a proliferação celular, também induzem ao recrutamento e à diferenciação de células inflamatórias na região da lesão (DOS REIS, S. O. et al., 2019; ZHANG, Xinwen et al., 2017).

Existe indicação de que a inflamação pode causar aumento das espécies reativas de oxigênio danificando outras biomacromoléculas além do DNA, como lipídios e proteínas, levando a disfunção destas. No caso de perda da função de uma proteína antioxidante aumenta-se o estresse oxidativo levando ao desenvolvimento do câncer. E por outro lado, o próprio estresse oxidativo também leva a um ambiente inflamatório (DOS REIS, S. O. et al., 2019; MURATA, 2018).

A inflamação possui papel na patogênese do CCR, visto que há evidências de que a resposta inflamatória na tentativa de eliminar a lesão pode aumentar a carcinogênese e sua progressão, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL) 6 e 1, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator

de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Além disso, existe uma forte associação entre a duração e a extensão da inflamação da mucosa na doença inflamatória do intestino e o desenvolvimento de câncer colorretal (LITTLE et al., 2017).

Os níveis séricos de várias citocinas encontram-se alterados em pacientes com câncer colorretal, e existe a indicação de que o aumento dos níveis plasmáticos dessas citocinas pode ter um valor para o prognóstico da doença. As citocinas secretadas pelo estroma tumoral podem alterar o crescimento do tumor e aumentam a capacidade de invasão das células tumorais, por meio da ativação das vias de sinalização oncogênica, incluindo ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B por TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e ativação de STAT3 pela IL-6 (KLAMPFER, 2011).

A interleucina IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos ativados e induz a expressão de TNF $\alpha$ , IL-6, IL8, IL-17, COX-2 e PGE2, que são importantes mediadores pró-inflamatórios e promovem crescimento de células tumorais. São, portanto, um potencial alvo para terapias anticâncer (CZAJKA-FRANCUZ et al., 2020; KLAMPFER, 2011). A IL-6, também produzida por macrófagos após a estimulação de células de câncer colorretal, é um fator de crescimento para estas e sua inibição interfere na progressão do CCR. Os níveis de IL-6 estão relacionados com estágio do tumor, tamanho, metástase e sobrevida do paciente (KLAMPFER, 2011).

Por outro lado, a IL-10 é um potente inibidor de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6, podendo ser alvo de terapias também (KLAMPFER, 2011). A IL-10 está envolvida no microambiente imunossupressor dentro do tumor, sendo secretadas por várias células do intestino, inclusive, as do CCR. Um nível elevado de IL-10 está associado a um prognóstico negativo (CZAJKA-FRANCUZ et al., 2020). A IL-2 induz a proliferação e ativação de linfócitos T citotóxicos e células Natural Killer e pode ser um indicador de atividade antitumoral sistêmica (CZAJKA-FRANCUZ et al., 2020).

Um estudo com pacientes de CCR mostrou valores elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ , todos pró-inflamatórios (MIRANDA et al., 2018). Outro estudo comparou pacientes de CCR com grupo controle e encontrou um perfil de citocina significativamente diferente entre eles, tendo o grupo com CCR nível de IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9 aumentados (CZAJKA-FRANCUZ et al.,

2020).

### **3.2.1.2 Biomarcadores do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo ocorre em resposta ao dano oxidativo causado quando as atividades antioxidantes e de eliminação do corpo não conseguem lidar com os oxidantes ativos produzidos por um estimulante prejudicial (RIBEIRO et al., 2018; WU, Rong et al., 2017)

É reportado na literatura que o estresse oxidativo exercem papel importante no mecanismo molecular do CCR em todos os estágios: iniciação, promoção e progressão, visto que a capacidade insuficiente do sistema antioxidante protetor pode resultar em câncer (CHANG et al., 2008; SKRZYDLEWSKA et al., 2001)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas no processo de iniciação e progressão do CCR. Em baixos níveis as ERO apresentam funções fisiológicas, mas essa condição se altera para um estado de toxicidade, quando em níveis aumentados, causando oxidação de proteínas, lipídios e DNA. Esse mecanismo é capaz de induzir desenvolvimento de tumores malignos por causar danos no DNA e mudanças genéticas, inibir a apoptose e promover a proliferação, invasão e metástase de células malignas (CHANG et al., 2008; WU, Rong et al., 2017; YÜCEL et al., 2012).

Os ataques aos lipídios da membrana, por parte dos radicais livres, levam à peroxidação lipídica e os produtos gerados também se tornam reativos favorecendo a iniciação da carcinogênese. O malondialdeído (MDA) é um desses produtos e pode ser um biomarcador do estresse oxidativo relacionado aos lipídios, porém os estudos para esse parâmetro são contraditórios, encontrando valores elevados e baixos para MDA no CCR (CHANG et al., 2008; GOPČEVIĆ et al., 2013). Chang et al. (2008) encontraram valores diminuídos de MDA, ao passo que Skrzydlewska et al. (2001), Gopcevic et al (2013) e Yucel et al. (2012) encontraram valores aumentados em todos os estágios do câncer colorretal, sugerindo estresse oxidativo presente, além disso a concentração de MDA aumenta com a progressão do tumor.

O sistema de defesa antioxidante pode ser de caráter enzimático e não enzimático, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e vitaminas A, C, E. Essas substâncias são importantes

no metabolismo normal do corpo e encontram-se diminuídas no câncer, levando a maiores danos celulares (CHANG et al., 2008; GOPČEVIĆ et al., 2013; RIBEIRO et al., 2018).

O estudo com pacientes de CCR de Chang et al. (2008) mostrou que as atividades de SOD, CAT, GSH-Px e vitaminas E e C estavam significativamente diminuídas, evidenciando a presença de estresse oxidativo e apoiando a hipótese de lesão mediada por radicais livres em pacientes com câncer colorretal. Ainda, as enzimas SOD, CAT e GSH-Px analisadas por Gopcevic et al. (2013) também estavam diminuídas em pacientes com CCR. Skrzydlewska et al. (2001), encontraram SOD aumentada no CCR, porém CAT, GSH-Px e vitamina E diminuídas.

Além do estresse oxidativo ser medido pelo sistema antioxidante, o dano oxidativo ao DNA e ao RNA produz 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) e 8-OHG (8-hidroxi-guanoseno), respectivamente, que são marcadores conhecidos do dano de nucleosídeo oxidado. Chang et al. (2008), também analisaram 8-OHdG nos pacientes e este se encontrava elevado, novamente sugerindo estresse oxidativo (CHANG et al., 2008; YÜCEL et al., 2012).

### **3.2.2 Alterações locais no CCR**

#### **3.2.2.1 Integridade da barreira intestinal**

A barreira intestinal é basicamente formada por uma camada de enterócitos e junções intercelulares de enterócitos. Quando esta encontra-se prejudicada ocorre a promoção da translocação de antígenos luminiais para os tecidos subepiteliais, causando respostas inflamatórias locais e sistêmicas, que podem ser as principais alterações patogênicas para várias doenças gastrointestinais, como o câncer (CHEN et al., 2018).

A disfunção ou perda da integridade da barreira intestinal é comum em pacientes com doenças críticas, o que aumenta a taxa de mortalidade quando comparados com indivíduos com a integridade preservada (SANDOVAL-RAMÍREZ et al., 2020). A inflamação e o dano oxidativo podem destruir gravemente a integridade intestinal (CHEN et al., 2018).

O câncer colorretal leva à disfunção da barreira da mucosa intestinal

causando aumento da permeabilidade intestinal, esta relaciona-se com a carga do tumor, desta forma diminuir o dano à barreira da mucosa intestinal pode inibir o crescimento tumoral. O aumento da permeabilidade intestinal é evidenciado pelo aumento do nível plasmático de lipopolissacarídeos, e a desregulação na expressão de algumas proteínas pode ser o causador desse aumento, como a BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) e receptor do tipo Toll 4 (TRL4) (SANDOVAL-RAMÍREZ et al., 2020; WU, Yan Yan et al., 2018).

No câncer colorretal, o comprometimento do epitélio intestinal e consequente disfunção da barreira intestinal facilita a translocação de microrganismos do lúmen para a lâmina própria, induzindo citocinas como IL-17 e IL-23, que agem para manter o microambiente inflamatório dentro do tumor (MONTALBAN-ARQUES; SCHARL, 2019).

Assim, em vista a manutenção da integridade da barreira intestinal, dois processos são fundamentais: a proliferação, diferenciação e autorrenovação contínuas do epitélio intestinal e a vedação adequada da barreira (ROBRAHN; JIAO; CRAMER, 2020).

### **3.2.2.2 Ácidos graxos de cadeia curta**

A relação da lipidômica com a incidência de câncer tem gerado grande interesse na comunidade científica, visto que a literatura sugere que as alterações dos lipídios poderiam fornecer a possibilidade de desenvolvimento de novos biomarcadores para a terapia com CCR (PARK, Chulhun et al., 2020).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, butirato e propionato são produtos finais da fermentação de fibras alimentares produzidos pela microbiota intestinal, e são rápida e eficientemente absorvidos pelas células intestinais. O butirato é utilizado pelos colonócitos como fonte de energia e possui funções celulares, ao passo que o propionato e acetato podem apresentar efeitos distantes do seu local de produção por serem liberados para a circulação portal (FATTAHI; HEIDARI; KHOSROUSHAHI, 2020).

Diferentes receptores de ácidos graxos livres (FFARs) têm sua expressão aumentada na superfície de várias células cancerosas humanas, o que poderia mediar sua proliferação, migração e metabolismo (PARK, Chulhun et al., 2020). Os AGCC podem interagir com os FFARs 2 e 3 mediando a inibição do

crescimento do câncer colorretal (BINDELS; DEWULF; DELZENNE, 2013).

Em uma recente revisão conduzida por Campos-Perez e Matinez-Lopez (2021), sugere-se que há fortes evidências de que os ácidos graxos de cadeia curta possuem uma importante função no metabolismo de lipídios e glicose, além de também possuírem atividades anti-inflamatórias que regulam a migração de células imunes, adesão, expressão de citocinas, proliferação, ativação e apoptose celular (CAMPOS-PEREZ; MARTINEZ-LOPEZ, 2021).

Estudos também mostraram que a concentração de bactérias produtoras de butirato encontram-se diminuídas nas fezes humanas em diferentes tipos de doenças do cólon, como o câncer colorretal (WANG et al., 2012; ZHANG, Hong et al., 2019). Além disso, os AGCC reduzem o risco do câncer de cólon (NILSSON et al., 2003) por meio da indução de apoptose e limitação da proliferação em células específicas do câncer (HINNEBUSCH et al., 2002; TIAN, Yun et al., 2018), pela autofagia (DONOHOE et al., 2011), e, ainda, limita a ativação de NF- $\kappa$ B e expressão de COX-2 (TIAN, Yun et al., 2018). Uma revisão de literatura concluiu que o butirato interrompe o ciclo celular e induz a apoptose em células cancerosas, mas não afeta a proliferação de células epiteliais normais do intestino (WATSON, 2006).

### **3.3 Compostos bioativos do café verde**

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e tem sido relacionado a um papel protetor na saúde, principalmente no que se refere às doenças crônicas. Esse papel se dá pela seu conteúdo antioxidante, proveniente da ampla variedade de compostos fenólicos, os quais apresentam papel protetor contra diversas doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (BHANDARKAR et al., 2019; MUÑOZ et al., 2020a; SILVA FARIA et al., 2020).

O termo café verde refere-se ao fruto maduro do grão de café, não torrado, não processado e natural (SANLIER; ATIK; ATIK, 2019). Apesar do café torrado ter uma maior popularidade devido as suas preparações, o café verde se destaca por seu potencial nutricional.

Entre os compostos bioativos presentes no café verde, os compostos fenólicos se destacam por sua atividade antioxidante, por exemplo, ácidos

clorogênicos, cafeico, ferúlico e cumárico. E além dessa classe, existem outros metabólitos como os diterpenos kahweol e cafestol, os triterpenos, a cafeína e a trigonelina (CASTRO et al., 2018; MUÑOZ et al., 2020a; SANLIER; ATIK; ATIK, 2019).

O café verde é rico em compostos com efeitos benéficos bem conhecidos como os ácidos clorogênicos e ácido cafeico, além de compostos importantes como a cafeína e trigonelina, que tem habilidade em diminuir o risco de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como por exemplo o câncer (BHANDARKAR et al., 2019; SILVA FARIA et al., 2020).

A cafeína e o ácido clorogênico presentes no café verde estão associados aos efeitos benéficos à saúde, como atividade antioxidante, anti-inflamatório, anti-obesogênico (BHANDARKAR et al., 2019; MACHEINER et al., 2019). Sugere-se que o café verde possua maior teor de compostos antioxidantes que o café torrado; devido às perdas de compostos bioativos durante o processo de torra, na sua maior parte os compostos fenólicos, reduzindo sua capacidade antioxidante (BHANDARKAR et al., 2019; MACHEINER et al., 2019; MUÑOZ et al., 2020a).

A cafeína é um alcaloide presente no café e é apontada como uma substância protetora contra o dano celular por seus efeitos antioxidantes benéficos (CASTRO et al., 2018; KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019). É o componente mais estudado do café por estar envolvida em vários efeitos fisiológicos, como a termogênese e a estimulação metabólica, pelo qual já é bastante conhecida (BHANDARKAR et al., 2019; BOETTLER et al., 2011; KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019). A sua ingestão está relacionada com a diminuição de biomarcadores do estresse oxidativo, como a glutatona, além de prevenir a oxidação da mesma e de ser capaz de eliminar radicais livres, principalmente o radical hidroxila. A cafeína apresenta capacidade antioxidante semelhante à da glutatona e superior a do ácido ascórbico (KACZMARCZYK-SEDLAK et al., 2019).

Os ácidos clorogênicos (CGA) são gerados a partir da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido trans-cinâmico, os mais comuns encontrados no café verde são monoésteres do ácido cafeoilquínico, o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA), que apresentam forte atividades antibactericida e antioxidante (CASTRO et al., 2018; GOUTHAMCHANDRA et al., 2017). São



compostos fenólicos de relevância tanto por sua contribuição para o sabor quanto por seus potenciais benefícios à saúde humana e são os ácidos fenólicos encontrados em maior abundância no café verde, sendo os principais compostos bioativos deste (BHANDARKAR et al., 2019; CASTRO et al., 2018). Além disso, os ácidos clorogênicos do café verde são biodisponíveis, visto que quase 30% são encontrados no plasma 8 horas após sua ingestão. O consumo desse produto provoca a absorção de todo o espectro dos ácidos clorogênicos encontrados no café verde (BHANDARKAR et al., 2019; MACHEINER et al., 2019).

A trigonelina é um alcaloide vegetal e sua acumulação ocorre em sementes de várias espécies e legumes e principalmente no café. No café verde é produzida pelo ácido nicotínico. Estudos apontam efeitos hipoglicêmicos, hipolipidêmicos, sedativos, anti-enxaqueca, antibacterianos, antivirais e antitumorais, além de melhorar a retenção da memória e inibir a agregação plaquetária (ZHOU; ZHOU; CHAN, 2012). Desta forma, os estudos sobre a bioatividade da trigonelina estão focados na redução do risco de doenças cardiovasculares, neuroproteção e anticarcinogênicos (ZHOU; ZHOU; CHAN, 2012).

De uma forma geral, a concentração de compostos bioativos do café verde é superior ao do café torrado, especialmente no que se refere ao conteúdo de ácido clorogênico, como apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 - Composição de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico no café verde e torrado.**

<b>Variedade</b>	<b>Cafeína (g/100g)</b>	<b>Trigonelina (g/100g)</b>	<b>Ácido clorogênico (g/100g)</b>	<b>Autor</b>
<b>Café verde</b>				
<i>C. canephora</i>	2,38	1,00	4,70	(BICHO et al., 2013)
	5,17	-	9,18	(BUDRYN, Grazyna et al., 2014)
	-	-	7,09	(GUTIÉRREZ ORTIZ et al., 2019)
	1,76	-	1,55	(WONGSA et al., 2019)
	1,43	4,13	7,16	(LE MOS et al., 2020)
<i>C. arabica</i>	1,45	1,38	4,43	(BICHO et al., 2013)
	-	-	5,90	(GUTIÉRREZ ORTIZ et al., 2019)
	1,19	0,91	4,22	(SU ALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020)
	0,97	0,65	3,13	(ACIDRI et al., 2020)
<b>Café torrado</b>				
<i>C. canephora</i>	3,80 a 3,98	-	0,56 a 1,04	(CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016)
	1,76	-	1,55	(WONGSA et al., 2019)
<i>C. arabica</i>	1,08	0,95	1,70	(KITZBERGER; SCHOLZ; BENASSI, 2014)
	1,30	0,85	1,00	(ACIDRI et al., 2020)
	1,16	0,84	1,94	(SU ALEH; TOLESSA; MOHAMMED, 2020)

Nos estudos de Acidri et al. (2020), Sualeh, Tolessa e Mohammed, (2020), observa-se que houve redução de ácido clorogênico após o processo de torra. Em relação à cafeína observa-se que o processo de desidratação, promovido pela torra, promoveu a concentração desse composto, sugerindo que a cafeína, diferentemente do ácido clorogênico, é estável com o aumento da temperatura. Existem divergências entre os valores de trigonelina do café verde para o torrado, mas a literatura aponta que na torrefação aproximadamente 85% da trigonelina é decomposta (ZHOU; ZHOU; CHAN, 2012).

Não somente o processo de torra é justificativa para as diferenças nos teores desses compostos no café, sabe-se que as variações dos ambientes podem influenciar na composição química do café, então vai além da variabilidade genética encontrada entre conilon e arábica, mas também pelas condições agrônômicas, como a colheita em diferentes tipos de maturação, local de cultivo e a adubação (BARBOSA et al., 2019; LEMOS et al., 2020).

### **3.4 Café verde e efeitos na saúde**

O café verde por ser considerado um alimento funcional devido aos compostos que possui e vem tornando-se um produto utilizando na sua forma isolada ou como ingrediente em preparações. O extrato de café verde é conhecido por seu potencial antioxidante, principalmente, pelos compostos bioativos que possui (ACIDRI et al., 2020). Outras propriedades, entretanto, ganham destaque, como efeitos anti-inflamatórios e antimutagênicos que diminuir o risco de desenvolver tumores, doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e reumatológicas, devido a seus componentes (BUDRYN, Grażyna; ZACZYŃSKA; RACHWAŁ-ROSIĄK, 2016). Ainda, tem sido atribuído ao extrato de café verde os efeitos terapêuticos em doenças como obesidade e diabetes, por estarem relacionados com a modulação do metabolismo de lipídios e glicose tanto em distúrbios genéticos quanto em distúrbios do metabolismo saudável (NAVEED et al., 2018). Sugere-se que o extrato de café verde protege contra o estresse oxidativo das células  $\beta$ , reduz os níveis de triglicerídeos, glicose e glutathione oxidada, apresentando efeito antidiabético; e também é útil para reduzir a síndrome metabólica pela modulação do diabetes tipo 2 em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (BUDRYN, Grażyna et al., 2017). Também foi reportado que o consumo de ácidos clorogênicos provenientes desse extrato leva à redução do risco de Alzheimer e doenças cardiovasculares (GOUTHAMCHANDRA et al., 2017), além de apresentarem propriedades antivirais, antibactericida (BHARATH; SOWMYA; MEHTA, 2015), antifúngica e antimicotoxigênico (SUÁREZ-QUIROZ et al., 2013).

Os impactos do café verde na saúde humana estão relacionados principalmente às suas propriedades antioxidantes, capazes de reduzir o risco de câncer, incluindo o câncer colorretal, diabetes, doenças hepáticas, doença

de Parkinson, entre outras (HU et al., 2019; SANLIER; ATIK; ATIK, 2019).

Os componentes do café verde possuem uma ampla gama de propriedades bioativas que podem reduzir a genotoxicidade induzida por carcinógenos (FERK et al., 2014; LI, Xiao et al., 2013). O estudo de Amigo-Benavent et al. (2017) reporta que o consumo regular de café verde apresenta efeitos antiproliferativo em células cancerosas (AMIGO-BENAVENT et al., 2017). A variação dos tipos de câncer no mundo é evidência da importância dos fatores ambientais na determinação dos padrões de câncer. Além dos ambientais, os fatores como altura, peso ao nascer ou IMC no início da vida também são preditores de vários tipos de câncer (WISEMAN, 2019). Levando em consideração esses fatores ambientais, a nutrição encontra-se como um fator-chave na determinação do câncer, onde condições nutricionais relacionadas aos componentes da dieta podem impactar nas características celulares (LITTLE et al., 2017; WISEMAN, 2019). O entendimento do desenvolvimento do câncer a nível molecular tem aumentado nas últimas décadas, e outros componentes de um tumor, além da célula cancerosa, são importantes no desenvolvimento e progressão do câncer. Diversos genes e vias moleculares podem ser alteradas de forma que conduza a essas alterações (WISEMAN, 2019). Além disso, alguns fatores também são importantes determinantes da suscetibilidade ao câncer, como a capacidade do organismo de combater o estresse, tanto de agentes exógenos quando endógenos, tais como o metabolismo oxidativo normal e erros do ciclo celular. E as condições nutricionais podem tanto diminuir quanto manter ou aumentar essa capacidade (LITTLE et al., 2017; WISEMAN, 2019).

Ainda que se sabe da existência de carcinógenos ambientais capazes de superar mecanismos de proteção endógeno como os processos de reparo do DNA, a maior dificuldade é em relação ao câncer sem causa externa conhecida, como é o caso do câncer de cólon (CCR) (WISEMAN, 2019).

### **3.5 Efeitos do café verde no câncer colorretal**

Os antioxidantes presentes nos alimentos podem atuar como fator de proteção contra o desenvolvimento de câncer colorretal (CCR), reduzindo o desenvolvimento de focos de cripta aberrantes. Cafeína, ácido clorogênico e trigonelina são as principais substâncias encontradas no café verde que produzem atividade anticâncer, podendo estar relacionada a sua capacidade

antioxidante (GAWLIK-DZIKI et al., 2014; HU et al., 2019; ZHOU; ZHOU; CHAN, 2012).

A Tabela 2 apresenta um resumo de estudos relacionando o extrato de café verde ou seus compostos com o câncer colorretal e/ou seus fatores de risco.

**Tabela 2 – Estudos com café verde ou seus compostos majoritários e seus efeitos no câncer colorretal.**

<b>Composto</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Modelo Experimental</b>	<b>Tempo</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Autor</b>
Ácido clorogênico (CGA7) de extrato de café verde	1,0 mg/mL	Células HCT-116 de câncer de cólon humano	24 – 48 horas	CGA7 citotóxico para HCT-116; CGA7 induz apoptose em HCT-116.	(GOUTHAMCHA NDRA et al., 2017)
Ácido clorogênico	0,5 – 2 mM	Células Caco-2	-	Inibe a produção de IL-8 induzida por TNF-a e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(SHIN et al., 2015)
Trigonelina e Ácido clorogênico	1-100 ug/mL	Células HT-29 e Caco-2	-	Diminuição os níveis de espécies reativas de oxigênio.	(BAKURADZE et al., 2010)
Ácido clorogênico	125, 250, 500 ou 1000 umol/L	Células HCT-116 e HT-29	72 horas	Inibe a viabilidade das células de CCR e para o ciclo celular de forma dose dependente; ACG aumenta Nrf2.	(Hou et al. 2017)
Cafeína	0,1 – 100 uM	Células HT29 de câncer colorretal humano	72 horas	Diminuição do potencial de proliferação e migração; inibiu crescimento das células; diminuiu fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).	(MERIGHI et al., 2007)

**Tabela 2 – Continuação.**

Extrato de café verde	500 e 1000 ppm	Células Caco-2 e HT-29	72 horas	Efeito antiproliferativo em células de câncer colorretal.	(Mojica et al. 2018)
Extrato de café verde	1 – 10 pg/mL	Células HT-29	48 horas	Aumento do nível de Nfr2 nuclear.	(BOETTLER et al., 2011)
Ácido clorogênico	20 e 50 mg/kg	Ratos Sprague Dawley com injeção de LPS (1 mg/kg)	15 dias	Melhora da inflamação e integridade intestinal; regulação da expressão de proteínas de junção.	(RUAN et al., 2014)
Ácido clorogênico	0,35 mg/mL	Camundongos fêmeas C57BL/6	15 dias	Suprimiu a secreção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , e IL-6, e a infiltração de macrófagos, células T e neutrófilos; diminuiu colite.	(ZHANG, Zhan et al., 2017)
Ácido clorogênico	100 ou 1000 mg/kg na dieta	Camundongos machos com CCR induzido por azoximetano	20 semanas	Não apresentou efeitos no FCA ou desenvolvimento.	(PARK, Hea Jin et al., 2010)
Ácido clorogênico	50 mg/kg	Ratos Sprague Dawley	14 dias	Proteção da barreira intestinal e alívio do estresse oxidativo.	(XUE et al., 2019)
Ácido clorogênico	354 mg/kg	Camundongos fêmeas C57BL/6	15 dias	Suprimiu a colite induzida por sal de sódio de sulfato de dextrano.	(SHIN et al., 2015)

Um dos mecanismos fundamentais para proteção contra o câncer colorretal é a proteção contra danos induzidos por espécies reativas de oxigênio. As células possuem mecanismos de defesa quando o estresse oxidativo, como a indução de enzimas de Fase II (desintoxicantes), e sua deficiência está relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer colorretal (BOETTLER et al., 2011).

Em um estudo utilizando o extrato de café verde, Mojica et al. (2018) concluíram que a proliferação das células de câncer colorretal Caco-2 e HT-29 foi diminuída com a presença de extrato de café verde *in vitro*, evidenciando a ação antioxidante desse alimento funcional. Em outro estudo, realizado por Boettler et al. (2011), utilizou-se extratos de café verde para avaliar uma possível modulação da translocação nuclear do Nrf2 e consequente aprimoramento da transcrição de enzimas da Fase II. Estes autores observaram que o extrato de café verde aumentou potentemente os níveis nucleares de Nrf2 em células de câncer colorretal HT-29. E, ao analisarem os compostos do café verde separadamente, observaram que o ácido clorogênico foi identificado com um indutor potente da translocação nuclear de Nrf2 nessas células.

A trigonelina, composto abundante do café verde, pode exercer atividade anticâncer de duas formas, prevenindo a invasão celular, que já é fator de proliferação de células cancerígenas, e o outro é pela regulação do fator de transcrição Nrf2 (BOETTLER et al., 2011). O fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) é regulador da resposta antioxidante do organismo, sendo um importante mecanismo para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular (BOETTLER et al., 2011; MIMURA; ITOH, 2015). No estudo de Bakuradze et al. (2010), a trigonelina foi importante na diminuição estresse oxidativo de células do câncer colorretal HT-29 e Caco-2. Esta é apontada como capaz de suprimir o aumento induzido por EROs na capacidade de invasão de determinada célula cancerígena (ZHOU; ZHOU; CHAN, 2012).

A cafeína também apresentou efeito após células de câncer colorretal HT-29 serem expostas a ela, sendo capaz de diminuir o potencial de crescimento, proliferação e migração celular, além de diminuir o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MERIGHI et al., 2007).

Gouthamchandra et al. (2017), isolaram o ácido clorogênico (CGA7) proveniente do extrato descafeinado de café verde para avaliarem seu efeito anticâncer em células humanas de câncer colorretal, sendo observado que o CGA7 induziu apoptose e se



apresentou citotóxico para essas células. Os autores ainda concluíram que o ácido clorogênico proveniente do café verde pode atuar como um bom agente quimiopreventivo e terapêutico para a prevenção do câncer colorretal. Além disso, os ácidos clorogênicos ainda exercem essa atividade anticâncer através da redução da metilação do DNA por meio da inibição das metiltransferases de DNA (MAKIUCHI et al., 2016).

Estudos que utilizaram o composto de café verde isolado também apresentaram resultados interessantes, como os que usaram o ácido clorogênico em diferentes concentrações e modelos de células de câncer colorretal como Caco-2 (SHIN et al., 2015), HCT-116 e HT-29 (HOU et al., 2017), onde o ácido clorogênico inibiu a produção de IL-8 induzida por TNF- $\alpha$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a viabilidade das células e aumento Nrf2.

O ácido clorogênico foi bastante utilizado para estudos com modelo experimental animal, por ser o composto majoritário no café verde. Como por exemplo, dois estudos utilizaram ratos Sprague Dawley e perceberam que o ácido clorogênico exerceu atividade imunomoduladora e forneceu proteção entérica, e ainda regulou a expressão de proteínas de junção (RUAN et al., 2014), além de proteger a barreira intestinal e aliviar o estresse oxidativo (XUE et al., 2019).

Outros estudos utilizando camundongos fêmeas C57BL/6 observaram que o ácido clorogênico dietético pode melhorar a colite (SHIN et al., 2015; ZHANG, Zhan et al., 2017), que é um fator de risco para o desenvolvimento do CCR, resultando a atenuação geral de alterações macroscópicas e histológicas, secreção de citocinas inflamatórias e infiltração de células imunes (ZHANG, Zhan et al., 2017).

Atualmente, os estudos presentes na literatura focam nos compostos do café verde, mas este além de alimento funcional também é um fitocomplexo, que é a união de vários compostos químicos com atividade biológica, e estes presentes no café verde são muito estudados pela literatura, tendo suas funções estabelecidas, então a utilização do café verde na íntegra, e não apenas os compostos isolados, pode trazer sinergismo entre os constituintes. A sua utilização pode ser feita através de extratos e farinhas para suplementação na alimentação

### 3.6 Considerações finais

O café verde é um alimento funcional e dentre os seus compostos se destacam o ácido clorogênico, a cafeína e a trigonelina. Estes podem ser considerados anticarcinogênicos, com atuação relacionada, principalmente, com sua capacidade antioxidante.

Os estudos aqui apresentados são importantes e promissores na busca de formas de tratamento e prevenção do câncer colorretal. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para colocar em prática a utilização do café verde e seus compostos bioativos como agentes importantes para diminuir o risco de desenvolvimento da carcinogênese, tanto na iniciação quanto no seu desenvolvimento.

### 3.7 Referencias

ACIDRI, Robert et al. Phytochemical profile and antioxidant capacity of coffee plant organs compared to green and roasted coffee beans. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 1–18, 2020.

AMIGO-BENAVENT, M. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 125–138, 2017.

BAEZA, Gema et al. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. **Food Research International**, v. 62, p. 1038–1046, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.035>>.

BAKURADZE, Tamara et al. Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. p. 1734–1743, 2010.

BARBOSA, Mayara de Souza Gois et al. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, v. 292, p. 275–280, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.072>>.

BHANDARKAR, Nikhil S. et al. Green coffee ameliorates components of diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. April, p. 141–149, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.003>>.

BHARATH, Nagaraj; SOWMYA, Nagur Karibasappa; MEHTA, Dhoom Singh. Determination of antibacterial activity of green coffee bean extract on periodontogenic bacteria like *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n. 2, p. 166–169, 2015.

BICHO, Natalina Cavaco et al. Identification of chemical clusters discriminators of Arabica and Robusta green coffee. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 4, p. 895–904, 2013.

BINDELS, Laure B.; DEWULF, Evelyne M.; DELZENNE, Nathalie M. GPR43/FFA2: Physiopathological relevance and therapeutic prospects. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 4, p. 226–232, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.02.002>>.

BOETTNER, Ute et al. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 426–440, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.03.011>>.

BUDRYN, Grazyna et al. Inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with chlorogenic acids (CHAs) from crude and purified aqueous extracts of green Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.). **Food Research International**, v. 61, p. 202–213, 2014.

BUDRYN, Grażyna et al. Green and roasted coffee extracts as antioxidants in  $\beta$ TC3 cells with induced oxidative stress and lipid accumulation inhibitors in 3T3L1 cells, and their bioactivity in rats fed high fat diet. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 8, p. 1323–1334, 2017.

BUDRYN, Grażyna; ZACZYŃSKA, Donata; RACHWAŁ-ROSIK, Danuta. Changes of free and nanoencapsulated hydroxycinnamic acids from green coffee added to different food products during processing and in vitro enzymatic digestion. **Food Research International**, v. 89, p. 1004–1014, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.011>>.

BUŁDAK, Rafał J. et al. The impact of coffee and its selected bioactive compounds on the development and progression of colorectal cancer in vivo and in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

CAMPOS-PEREZ, Wendy; MARTINEZ-LOPEZ, Erika. Effects of short chain fatty acids on metabolic and inflammatory processes in human health. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1866, n. 5, p. 158900, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158900>>.

CASTRO, A. C.C.M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48–57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.153>>.

CHANG, Dong et al. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 4, p. 286–289, 2008.

CHEN, Jiali et al. Chlorogenic acid improves intestinal barrier functions by suppressing mucosa inflammation and improving antioxidant capacity in weaned pigs. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 84–92, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.005>>.

CORSO, Marinês Paula; VIGNOLI, Josiane Alessandra; BENASSI, Marta de Toledo. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. **Journal of Food Science**

**and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1380–1388, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-2163-y>>.

CZAJKA-FRANCUZ, Paulina et al. Serum cytokine profile as a potential prognostic tool in colorectal cancer patients – one center study. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 25, n. 6, p. 867–875, 2020.

DALAL, Nishu et al. Omics technologies for improved diagnosis and treatment of colorectal cancer: Technical advancement and major perspectives. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 131, n. August, p. 110648, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110648>>.

DONOHOE, Dallas R. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 517–526, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>>.

DOS REIS, Schalana Oliveira et al. Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) Supplementation Reduces Aberrant Crypt Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of Carcinogenesis-Induced Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1649437>>.

FARAH, Adriana; DONANGELO, Carmen Marino. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FATTAHI, Yasin; HEIDARI, Hamid Reza; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari. Review of short-chain fatty acids effects on the immune system and cancer. **Food Bioscience**, v. 38, n. October, p. 100793, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100793>>.

FERK, Franziska et al. Protective effects of coffee against induction of DNA damage and pre-neoplastic foci by aflatoxin B1. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 2, p. 229–238, 2014.

GAWLIK-DZIKI, Urszula et al. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee-mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. **Food Research International**, v. 61, p. 48–55, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.002>>.

GOPČEVIĆ, Kristina R. et al. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 9, p. 2646–2652, 2013.

GOUTHAMCHANDRA, K. et al. Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 147–153, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>>.

GUTIÉRREZ ORTIZ, Anggy Lusanna et al. Distribution of p-coumaroylquinic acids in commercial *Coffea* spp. of different geographical origin and in other wild coffee species. **Food Chemistry**, v. 286, n. February, p. 459–466, 2019.

HAJIZADEH, Farnaz et al. Adenosine and adenosine receptors in colorectal cancer. **International Immunopharmacology**, v. 87, n. May, p. 106853, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106853>>.

- HINNEBUSCH, Brian F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 1012–1017, 2002.
- HOU, Ni et al. Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 28, n. 1, p. 59–65, 2017.
- HU, G. L. et al. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food and Function**, v. 10, n. 6, p. 3113–3126, 2019.
- HURLSTONE, David P.; CROSS, Simon S. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopic colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 20, n. 2, p. 173–181, 2005.
- JESZKA-SKOWRON, Magdalena; STANISZ, Ewa; DE PEÑA, Maria Paz. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 243–250, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.018>>.
- KACZMARCZYK-SEDLAK, Ilona et al. Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Archives of Medical Science**, v. 15, n. 4, p. 1073–1080, 2019.
- KITZBERGER, Cíntia Sorane Good; SCHOLZ, Maria Brígida dos Santos; BENASSI, Marta de Toledo. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, v. 61, p. 61–66, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.031>>.
- KLAMPFER, L. Cytokines, Inflammation and Colon Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 451–464, 2011.
- LEMOS, Mayara Fumiere et al. Chemical and sensory profile of new genotypes of Brazilian *Coffea canephora*. **Food Chemistry**, v. 310, n. October 2019, 2020.
- LI, Xiao et al. The Smc5/Smc6/MAGE Complex Confers Resistance to Caffeine and Genotoxic Stress in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- LITTLE, C. H. et al. The role of dietary polyphenols in the moderation of the inflammatory response in early stage colorectal cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2310–2320, 2017.
- MACHEINER, Lukas et al. Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, n. August, p. 103307, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103307>>.
- MAKIUCHI, Takeshi et al. Association between green tea/coffee consumption and biliary tract cancer: A population-based cohort study in Japan. **Cancer Science**, v. 107, n. 1, p. 76–83, 2016.
- MERIGHI, Stefania et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-

inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 395–406, 2007.

MIMURA, Junsei; ITOH, Ken. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 221–232, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.019>>.

MIRANDA, Diego O. et al. Elevated serum levels of proinflammatory cytokines potentially correlate with depression and anxiety in colorectal cancer patients in different stages of the antitumor therapy. **Cytokine**, v. 104, n. December 2016, p. 72–77, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.030>>.

MONTALBAN-ARQUES, Ana; SCHARL, Michael. Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: Implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy. **EBioMedicine**, v. 48, p. 648–655, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.050>>.

MUÑOZ, Adelaida Esteban et al. Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. **Lwt**, v. 128, n. December 2019, p. 109457, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109457>>.

MURATA, Mariko. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2018.

NAVEED, Muhammad et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 67–74, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>>.

NIEDERREITER, Lukas; ADOLPH, Timon E.; TILG, Herbert. Food, microbiome and colorectal cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 7, p. 647–652, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.030>>.

NILSSON, Niclas E. et al. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 4, p. 1047–1052, 2003.

OLIVEIRA, Leandro S. et al. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 235–239, 2006.

PARK, Chulhun et al. Importance of the fatty acid chain length on in vitro and in vivo anticancer activity of fattigation-platform albumin nanoparticles in human colorectal cancer xenograft mice model. **Journal of Controlled Release**, v. 324, n. February, p. 55–68, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.001>>.

PARK, Hea Jin et al. Chlorogenic acid differentially alters hepatic and small intestinal thiol redox status without protecting against azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 3, p. 362–370, 2010.

RIBEIRO, Carla Caroline Dias et al. Effects of grape juice in superoxide dismutase and catalase in colorectal cancer carcinogenesis induced by azoxymethane. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 10, p. 2839–2844, 2018.

ROBRAHN, Laura; JIAO, Long; CRAMER, Thorsten. Barrier integrity and chronic inflammation mediated by HIF-1 impact on intestinal tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 490, p. 186–192, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.002>>.

RODRIGUES, M. A.M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: Comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, p. 351–355, 2002.

ROMUALDO, Guilherme Ribeiro et al. Drinking for protection? Epidemiological and experimental evidence on the beneficial effects of coffee or major coffee compounds against gastrointestinal and liver carcinogenesis. **Food Research International**, v. 123, n. April, p. 567–589, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.029>>.

RUAN, Zheng et al. Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases expression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SANDOVAL-RAMÍREZ, Berner Andrée et al. Exploring the effects of phenolic compounds to reduce intestinal damage and improve the intestinal barrier integrity: A systematic review of in vivo animal studies. **Clinical Nutrition**, n. xxxx, 2020.

SANLIER, Nevin; ATIK, Azize; ATIK, Ilker. Consumption of green coffee and the risk of chronic diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2573–2585, 2019.

SHIN, Hee Soon et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. **Food Chemistry**, v. 168, p. 167–175, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.100>>.

SI, Huifang et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora. **Seminars in Cancer Biology**, v. 70, p. 3–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.05.004>>.

SILVA FARIA, Wanessa Costa et al. Antioxidant efficacy and in silico toxicity prediction of free and spray-dried extracts of green Arabica and Robusta coffee fruits and their application in edible oil. **Food Hydrocolloids**, v. 108, n. May, 2020.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 64, n. 3, p. 213–222, 2001.

SUALEH, Abrar; TOLESSA, Kassaye; MOHAMMED, Ali. Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. e05812, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05812>>.

SUÁREZ-QUIROZ, Mirna L. et al. Antibacterial activity and antifungal and anti-mycotoxigenic activities against *aspergillus flavus* and *a. ochraceus* of green coffee chlorogenic acids and dodecyl chlorogenates. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 3, p. 360–368, 2013.

TIAN, Yun et al. Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated

colorectal cancer development. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 57, p. 103–109, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.007>>.

WANG, Tingting et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 320–329, 2012.

WATSON, Alastair J.M. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 57, n. 2, p. 107–121, 2006.

WISEMAN, Martin J. Nutrition and cancer: Prevention and survival. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 5, p. 481–487, 2019.

WONGSA, Prinya et al. Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, n. May 2018, p. 579–587, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.088>>.

WU, Rong et al. Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2017.

WU, Yan Yan et al. Effects of berberine on tumor growth and intestinal permeability in HCT116 tumor-bearing mice using polyamines as targets. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 1447–1453, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.130>>.

XUE, Yanwen et al. Chlorogenic acid attenuates cadmium-induced intestinal injury in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, n. April, p. 110751, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110751>>.

YÜCEL, Ahmet Fikret et al. Relationship between the levels of oxidative stress in mesenteric and peripheral serum and clinicopathological variables in colorectal cancer. **Balkan Medical Journal**, v. 29, n. 2, p. 144–147, 2012.

ZHANG, Hong et al. Altered intestinal microbiota associated with colorectal cancer. **Frontiers of Medicine**, v. 13, n. 4, p. 461–470, 2019.

ZHANG, Xinwen et al. The Biology of Aging and Cancer: Frailty, Inflammation, and Immunity. **The Cancer Journal**, v. 23, n. 4, p. 201–205, 2017.

ZHANG, Zhan et al. Chlorogenic acid ameliorates experimental colitis by promoting growth of *Akkermansia* in mice. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 1–13, 2017.

ZHOU, Ji Yin; ZHOU, Shi Wen; CHAN, L. Trigonelline: A plant alkaloid with therapeutic potential for cardiovascular and central nervous system diseases. **Fitoterapia**, v. 83, n. 4, p. 617–626, 2012.



#### 4. ARTIGO ORIGINAL

##### **Efeito do extrato de café verde (*Coffea canephora*) nas alterações morfofisiopatológicas colorretal e inflamatórias local e sistêmica, em modelo animal de carcinogênese.**

#### **RESUMO**

O processo inflamatório e o estresse oxidativo são mecanismos associados à carcinogênese. Estudos com café verde apontam efeitos anticarcinogênicos, atribuindo a este classificação como alimento funcional, devido aos compostos bioativos neste presente como compostos antioxidantes, ácido clorogênico e cafeína. Objetivou-se avaliar o efeito do extrato aquoso de café verde em modelo animal de carcinogênese colorretal (CCR) por meio das alterações morfofisiológicas locais colorretal e alterações inflamatórias e oxidativas sistêmicas. Ratos machos Wistar foram utilizados como modelo para o câncer colorretal. A CCR foi induzida por 5 semanas, por meio da aplicação de dimetilhidrazina, e 10 semanas de desenvolvimento da lesão e intervenção com o extrato de café verde. Os animais foram divididos em 4 grupos, C (sem indução de câncer e sem extrato), T (com indução de câncer e sem extrato), CCV (sem indução de câncer e com extrato) e TCV (com indução de câncer e com extrato). Após o período experimental, amostras de sangue foram recolhidas para análises de alterações inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL 6, IL 12 e IL 10) e capacidade antioxidante total (T-AOC), ainda foram avaliadas a integridade intestinal (pH, permeabilidade intestinal, IgA), bem como as alterações neoplásicas e de crescimento, e a contagem de focos de criptas aberrantes (FCA). O ganho de peso e consumo dos animais não apresentaram diferença estatística sugerindo que a indução do câncer colorretal e a intervenção com extrato de café verde não influenciaram nesses quesitos. A contagem de FCA teve como objetivo comprovar o início do processo de carcinogênese, realizada na 10<sup>o</sup> semana de experimento, em que o grupo TCV apresentou valores maiores, chegando a um aumento de 51,1% nesse tipo de FCA. O extrato de café verde contribuiu para a integridade da barreira intestinal e aumento o pH do grupo TCV, embora não tenha apresentado diferença estatística nos níveis de AGCC. Sistemicamente, os grupos com indução de câncer (T e TCV) apresentaram maiores capacidades antioxidantes totais do plasma, mas não houve diferença nas alterações inflamatórias. Em relação ao microambiente tumoral, os grupos T e TCV não apresentaram diferenças estatísticas. A dosagem de IgA foi maior no grupo T, esses resultados indicam que o extrato de café verde seja capaz de estabilizar as alterações na mucosa causadas pela carcinogênese. Em conclusão, a atuação do extrato de café verde contribui para a diminuição do risco de desenvolvimento do câncer colorretal, por meio da atuação de seus compostos

bioativos no microambiente da lesão neoplásica, na permeabilidade intestinal, abrindo possibilidades de novos estudos.

#### **4.1 Introdução**

O câncer colorretal (CCR) é um dos mais prevalentes no mundo, estando em quarto lugar entre homens e mulheres (WHO, 2021a) . A origem desta doença é multifatorial, dependendo da interação de fatores genéticos, como a predisposição e idade avançada, e de fatores ambientais, como a dieta e consumo de álcool, que agredem o tecido intestinal e diminuem sua capacidade de defesa antioxidante (INCA, 2021).

O processo inflamatório, mediado pela produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucinas (IL) inflamatórias (IL1, IL6, IL8, IL12) (KLAMPFER, 2011; LITTLE et al., 2017; NIEDERREITER; ADOLPH; TILG, 2018) e o estresse oxidativo, com o aumento de radicais livres e redução da capacidade antioxidante, (DOS REIS, S. O., et al., 2019; MURATA, 2018), estão intimamente relacionados à carcinogênese colorretal. Desse modo, o manejo da inflamação e do processo oxidativo, por meio de alimentos ou extratos ricos em antioxidantes, pode configurar uma estratégia para reduzir o risco de CCR ou mesmo para reduzir a progressão desta doença (DE SOUSA MORAES et al., 2019).

O café verde é a forma de fruto do café cru, não torrado, não processado e natural, e é considerado um alimento funcional devido aos compostos que possui, crescendo como um produto cada vez mais consumido (SANLIER; ATIK; ATIK, 2019). A torrefação ocasiona destruição parcial de alguns compostos importante do café, afetando drasticamente a composição fenólica, como o ácido clorogênico e a trigonelina, diminuindo a capacidade antioxidante do café e concentrando o teor de cafeína no café torrado (BAEZA et al., 2014; BHANDARKAR et al., 2019; MUÑOZ et al., 2020b).

Segundo Castro et al. (2017), os compostos fenólicos presentes no café verde se destacam dentre os seus compostos bioativos por sua atividade antioxidante, sendo os ácidos clorogênicos a principal classe. Alguns estudos com café verde apontam seus efeitos anticarcinogênicos, incluindo a capacidade de inibir o CCR *in vitro* (CASTRO et al., 2018; GOUTHAMCHANDRA et al., 2017; SARRIÁ et al., 2016). No entanto, o tema ainda é controverso, visto que outros estudos indicam que, apesar da

presença de compostos com potencial anticarcinogênicos no café, existe relação entre o seu consumo e o risco de CCR (LUDWIG et al., 2014). Porém, esses resultados que buscam por relação do consumo de café aumentando o risco de desenvolver CCR são inconclusivos (GALEONE et al., 2010; LI, Guowei et al., 2013; TAVANI; VECCHIA, 2004), sendo que apenas um desses reportou significância, quando o consumo é maior que quatro xícaras de café por dia (TIAN, Changwei et al., 2013).

Considerando que os danos causados pelo estresse oxidativo podem levar ao processo inflamatório e a alterações patológicas, aumentando o risco de desenvolvimento da carcinogênese colorretal ou agravando a condição pré-existente, justifica-se a utilização do café verde devido ao conjunto de compostos bioativos como o ácido clorogênico, a cafeína e a trigonelina presentes, na intenção de inibir esses radicais livres produzidos, assim auxiliando na diminuição da gravidade do CCR.

A hipótese do estudo foi de que a suplementação dietética com extrato de café verde contribua para minimizar o desenvolvimento da doença, em modelo animal de CCR induzida. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato de café verde na carcinogênese, por meio das alterações morfofisiológicas locais colorretal e alterações inflamatórias e oxidativas sistêmicas, em modelo animal.

## **4.2 Materiais e métodos**

O estudo foi realizado nos Laboratórios dos Departamentos de Engenharia de Alimentos e de Farmácia e Nutrição da Universidade do Espírito Santo (UFES), campus Alegre.

As amostras de café verde do tipo Conilon (*Coffea canephora*) foram adquiridas de produtores da propriedade Encosta do Caparaó, no município de Castelo – ES (-20,5727167, -41,3150810), referentes à safra de 2019. Conforme informações dos produtores, o café é colhido por meio de colheita manual e posteriormente seco em secador horizontal rotativo de fogo direto, a uma temperatura média de 150°C, até umidade final de 13%.

### **4.2.1 Extrato Aquoso de Café Verde**

Os grãos de café verdes foram moídos em moinho de facas tipo Willy SL-31 (Solab, Brasil) e em seguida peneirados (18 mesh) para obtenção de tamanho de partículas entre 1 a 1,18 mm, armazenados ao abrigo da luz até utilização para os extratos (NEVES, et al., 2019). O extrato aquoso foi obtido diariamente utilizando 60 g de café verde moído em 100 mL de água a 90°C, utilizando um sistema de filtração simples com filtro de papel.

#### **4.2.2 Determinação dos teores de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina**

A determinação dos teores de cafeína, ácido clorogênico (5-ACQ) e trigonelina no extrato de café verde foi obtida utilizando-se um sistema cromatográfico HPLC Acquity (Waters Corporation, EUA), equipado com sistema de bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). As amostras e a fase móvel foram filtradas em membranas de 0,42 µm antes da análise. Injetou-se 20 µL das amostras de extrato aquoso (diluído na proporção 1:5 v/v) em uma coluna de fase reversa C18 (21 x 50 mm, 1,7 µm, Waters Acquity), mantida a 40°C. A fase móvel utilizada foi composta por metanol, água e ácido acético na proporção de 20:80:1 (v/v), com fluxo de 1 mL/min, eluição isocrática e com tempo de corrida de 10 minutos. A identificação dos compostos foi feita a 272 nm, comparando-se padrões comerciais com os compostos de interesse, e a quantificação feita com concentrações conhecidas dos compostos (Ácido clorogênico:  $y = 2E+07x + 5E+06$ ;  $R^2 = 0,9485$ ; Cafeína:  $y = 4E+07x + 1E+07$ ;  $R^2 = 0,9473$ ; Trigonelina:  $y = 2E+07x - 2E+06$ ;  $R^2 = 0,9148$ ).

#### **4.2.3 Determinação do teor de compostos fenólicos totais no café verde**

Inicialmente, pesou-se 1 g de amostra de café verde moído, previamente homogeneizada, acrescentando-se 10 mL de solução de extração constituída de metanol:água (60:40 v/v). Após agitação (180 rpm), em temperatura ambiente por 30 minutos, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm (1.000 g), por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e o volume completado com água destilada para 15 mL, e ainda diluídos na proporção de 1:30 (v/v) de modo a obter extratos na concentração de 0,022g de amostra triturada/mL.

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo ensaio do reagente Folin-

Ciocalteau, com base em metodologia adaptada (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Foi diluído 0,6 mL do extrato de café verde em 3,0 mL de reagente Folin Ciocalteau, previamente diluído em água destilada (1:10; v/v) e agitado em vórtex por 1 minuto. Após 3 minutos de repouso ao abrigo da luz, foram adicionados 2,4 mL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e agitado em vórtex por 1 minuto. A absorbância foi determinada a 765 nm por espectrofotometria, após 1 hora de repouso em ausência de luz. O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando-se curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/L de amostra).

#### **4.2.4 Análise da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS. Utilizou-se alíquotas de extratos obtidas para a determinação do teor de compostos fenólicos totais.

A análise de atividade antioxidante pelo método DPPH foi adaptada de (SCHERER; GODOY, 2009), em microplaca. Foram utilizados 280 µL de solução de DPPH (40 µg/mL) e 20 µL do extrato de café verde na concentração de 1,5 mg/mL. No branco foram utilizados 280 µL de DPPH (40 µg/mL) e 20 µL de água. Após a adição da solução de DPPH, as microplacas foram mantidas em repouso por 90 minutos no escuro. Após esse período, a atividade antioxidante foi medida a 517 nm, previamente calibrado com etanol puro. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Nesse ensaio, o Trolox foi utilizado para a curva de calibração ( $y = 4,5144x + 11,083$ ;  $R^2 = 0,9920$ ), e os resultados expressos como mmol equivalente de Trolox/L de amostra.

O método do radical ABTS foi realizado com modificações, segundo (RE et al., 1999). Uma diluição com concentração já conhecida do extrato de café verde (1,5 mg/mL) foi feita e em cada poço da microplaca foi acrescentado 30 µL da diluição e 270 µL da solução de ABTS. Para o branco foi utilizado água. A reação foi realizada ao abrigo de luz por 6 minutos e, posteriormente, lida a 734 nm. O Trolox foi usado como padrão para a curva de calibração ( $y = -0,0799x + 0,7197$ ;  $R^2 = 0,9893$ ), e os resultados expressos como mmol equivalente de Trolox/L de amostra.

#### **4.2.5 Estudo em modelo animal de CCR**

Foram utilizados 48 ratos machos adultos da linhagem Wistar (45 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável, com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro de 12 horas), temperatura de 23 °C ( $\pm 1$  °C) e receberam dieta e água *ad libitum*. Os animais foram desparasitados e permaneceram em ambientação por 7 dias. Procedeu-se ao controle diário do consumo alimentar e avaliação semanal do peso corporal. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Alegre, nº 032/2019 (Apêndice A).

#### **4.2.6 Delineamento Experimental**

Inicialmente, os animais foram divididos em: grupo C (controle negativo, sem indução de carcinogênese colorretal – CCR, n=24) e grupo T (controle positivo, com indução da CCR, n=24). A indução da carcinogênese colorretal ocorreu por meio da aplicação via subcutânea de 1,2-dimetilhidrazina (DMH - Sigma®) dissolvida em NaCl 0,9%, contendo 1,5% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como veículo e pH 6,5, na dose de 55 mg/kg de peso, sendo administradas semanalmente, no total de cinco aplicações (COUTO et al., 2019). Os animais receberam água e dieta (AIN-93 M) *ad libitum*.

Após as 5 semanas de indução da CCR, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, a saber:

Grupo C: controle negativo (sem indução de CCR e sem extrato aquoso de café verde, n=12);

Grupo T: controle positivo (com indução de CCR e sem extrato aquoso de café verde, n=12);

Grupo CCV: sem indução de CCR e com extrato aquoso de café verde (n=12);

Grupo TCV: com indução de CCR e com extrato aquoso de café verde (n=12).

Por um período de 10 semanas, os animais dos grupos CCV e TCV receberam dieta AIN-93M *per feed* (22 g/dia), suplementada com o extrato aquoso de café verde. Os grupos C e T receberam dieta AIN-93 M *per feed* (22 g/dia), porém sem suplementação. Após 5 semanas de consumo da dieta, 4 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados para avaliação de lesões pré-neoplásicas. Nesse período e ao final do tempo experimental (5 e 10 semanas de consumo de dietas experimentais), os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas, por um período de 24 horas, para coleta de urina e análise de permeabilidade intestinal. O período experimental total foi de 15 semanas, sendo 5 de indução do câncer e 10 com as dietas experimentais (Figura 1).

A ingestão foi registrada diariamente e o peso individual registrado semanalmente para o cálculo da média de ingestão total e ingestão dos compostos majoritários do extrato de café verde, média de ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar.

Ao final do experimento os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal de 0,2 mL/100 g peso corporal de solução anestésica contendo 15 mg/kg de peso de Xilazina e 60 mg/kg de peso de Cetamina. Após, foi realizada punção cardíaca e o sangue coletado foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C e armazenado a -80°C para análises de biomarcadores inflamatórios e do estresse oxidativo. O conteúdo do ceco foi coletado para determinação de pH e IgA secretora. O intestino grosso foi removido e armazenado a -80°C para posteriores análises.

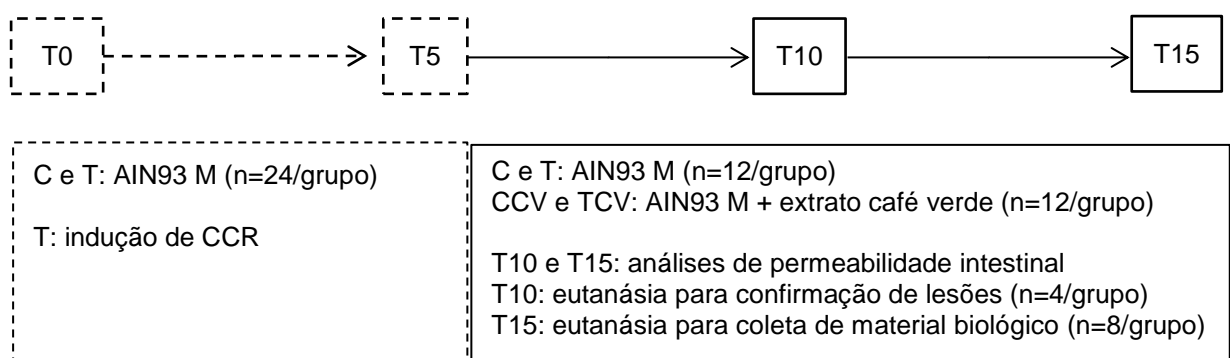


Figura 1 – Esquema do desenho experimental. T: semana; CCR: câncer colorretal; C: grupo controle negativo (sem indução de CCR, dieta AIN93 M); T: grupo controle positivo (com indução de CCR, dieta AIN93 M); CCV: sem indução de CCR, dieta AIN93 M + extrato de café verde; TCV: com indução de CCR + dieta AIN93 M + extrato de café verde.

#### 4.2.7 Dietas Experimentais

As dietas experimentais AIN-93M foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As dietas foram isocalóricas e com iguais teores de carboidratos, proteínas, lipídios e fibras, conforme exposto na Tabela 1. A quantidade do extrato aquoso de café verde ofertada dependeu dos resultados da análise do teor de cafeína, visto que a dosagem diária deste composto não deveria passar de 45 mg de cafeína/kg de peso (ILBÄCK; SILLER; STÅLHANDSKE, 2007). Dessa forma, foram ofertados 2 mL de extrato por dia contendo 11,05 mg de cafeína e 19,66 mg de ácido clorogênico. O extrato foi incorporado a dieta no momento da montagem dos pellets.

**Tabela 1** – Composição das dietas experimentais com base na AIN-93 M.

<b>Ingredientes (g/kg)</b>	<b>Grupos: C e T</b>	<b>Grupos: CCV e TCV</b>
Amido de milho	465,7	465,7
Amido dextrinizado	155,0	155,0
Albumina	140,0	140,0
Sacarose	100,0	100,0
Celulose	50,0	50,0
Óleo de soja (mL)	40,0	40,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
L-cistina	1,8	1,8
Extrato de café verde	-	2 mL
Energia (kcal/g)	3,6	3,6

#### 4.2.8 Permeabilidade Intestinal

Na 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semana foram realizadas as análises de permeabilidade intestinal,



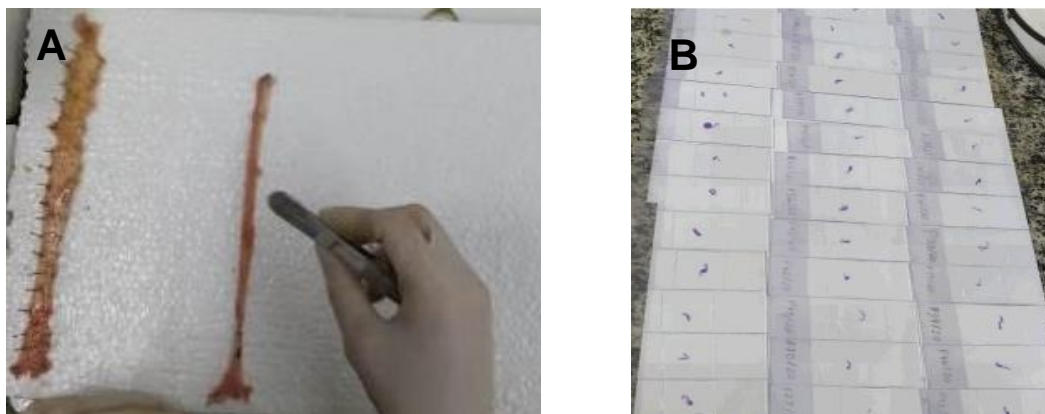
na qual os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam 1 mL de solução com 100 mg de lactulose e 50 mg de manitol por gavagem. Após a administração, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas e em jejum por mais 5 horas. A urina foi coletada durante 24 h, e o volume mensurado, registrado e armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para as análises de lactulose e manitol, a urina foi centrifugada (Hermle, modelo Z326K, Alemanha), filtrada em filtros de membrana Millipore de  $0,45\ \mu\text{m}$  (São Paulo, Brasil) e colocada em frascos para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fase móvel empregada foi água em  $0,005\ \text{mol/L}$  de ácido sulfúrico, fluxo da fase móvel de  $0,6\ \text{mL/min}$ , com volume de injeção da amostra de  $20\ \mu\text{L}$  (DE SÁ et al., 2011). Como padrões foram utilizados Lactulose® e Mannitol® (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP- Brasil). As concentrações de lactulose e manitol obtidas foram convertidas para g/L para calcular a percentagem de excreção urinária. A relação Lactulose/Manitol foi calculada dividindo a concentração de lactulose pela concentração de manitol como índice de permeabilidade intestinal (SONG et al., 2011).

#### **4.2.9 Preparação de Tecidos para a Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes (FCA)**

Todo o intestino grosso foi removido, aberto longitudinalmente na inserção do mesentério e enxaguado em solução salina (Fig. 2 - A). O ceco foi excisado e o cólon remanescente removido e fixado em formalina tamponada a 10% durante 24 h e corado com azul de metileno a 0,1% em tampão fosfato-salina durante 20 min para contagem de FCA. Em seguida, o excesso de corante foi lavado com água destilada e os intestinos analisados, com o lado da mucosa voltada para cima, sob um microscópio de luz (40x) (Haven, São Paulo) e o número de FCA determinado. A categorização dos FCA foi realizada com base no número de criptas aberrantes por foco, sendo focos com até três ou menos criptas ( $\text{FCA} \leq 3$ ) e focos com mais de três criptas ( $\text{FCA} > 3$ ) (BIRD; GOOD, 2000).

Na 15ª semana, foram coletadas da mucosa colorretal todas as lesões acima de 0,1 centímetro em sua maior porção. Essas foram fixados em formalina 10% tamponada e submetidos ao processamento rotineiro de inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de  $3\ \mu\text{m}$  de espessura e dispostos

em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina (Fig. 2 – B). Todas as amostras dos grupos experimentais, com exceção do grupo controle negativo (intestinos normais) foram diagnosticadas de acordo com PERŠE e CERAR (2011).



**Figura 2** – Preparo histológico para contagem de FCA. Intestino grosso aberto longitudinalmente e preparação para fixar (A), Alterações macroscópicas laminadas (B).

#### **4.2.10 pH Intraluminal do Cólon**

Após remoção do intestino grosso dos animais, o conteúdo luminal do ceco foi retirado, pesado, diluído na proporção 1:10 em solução salina e homogeneizado em vórtex modelo AP-56 (Phoenix Luterco, Araraquara, São Paulo, Brasil). Posteriormente, a leitura do pH foi realizada por meio de pHmetro de bancada da marca Kasvi®.

#### **4.2.11 Dosagem de IgA Secretora**

O conteúdo luminal cecal foi diluído com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2), homogeneizado por meio de um vortex e centrifugado a 3000 g (Hermle, modelo Z326K, Alemanha) por 10 min. A suspensão foi coletada e avaliada com base no ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) utilizando o kit Rat sIgA (Secretory Immunoglobulin A) (Elabscience, Biotechnology Inc., EUA), de acordo com as recomendações do fabricante para a determinação da IgA secretora (sIgA). A leitura das amostras foi efetuada em leitor de microplaca Thermo Scientific®, modelo

Multiskan GO, em comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.2.13 Quantificações de biomarcadores do perfil inflamatório e oxidativo**

Aa determinações sanguíneas de TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL) 6, 10 e 12 foram realizadas utilizando-se kit comercial específico Milliplex® Map (Millipore, St Charles-Missouri-USA), com a plataforma de tecnologia Luminex® citocinas Multiple Analyte Profiling. A leitura das amostras foi efetuada em leitor Luminex 200 - Software xPonent/Analyst versão 4.2, sendo os resultados expressos em pg/mL.

A determinação da capacidade antioxidante total (T-AOC) foi feita por meio de ensaio colorimétrico utilizando o kit comercial específico “Antioxidant Assay Kit” (Bio Assay, Hayard, CA /USA). A leitura das amostras foi efetuada em leitor de microplaca, Stat Fax modelo 2100 da marca Awareness Technology, em comprimento de onda de 750 nm e os resultados foram expressos como milimolar (mM) de Trolox equivalente (TE).

Para essa análise, a estatística foi feita comparando os grupos sem indução entre eles (C e CCV) e os grupos com indução do câncer entre eles (T e TCV).

#### **4.2.14 Análise estatística**

Inicialmente aplicou-se teste de Kolmogorov Smirnov para verificar a distribuição dos dados. Posteriormente, aplicou-se teste "t" para comparar o ganho de peso até a 5° semana de experimento, o consumo de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, e para a contagem de focos de criptas aberrantes (FCA). A ANOVA seguida de Tukey foi realizada para comparar as médias entre os grupos para ganho de peso da 5° a 15° semana, consumo per capita diário, coeficiente de eficiencia alimentar (CEA) e calórico (CEC), concentraçãode manitol e lactulose, pH intestinal, concentração de IgA, concentração de biomarcadores inflamatórios e determinação da capacidade antioxidante total. Foi aplicado teste estatístico qui-quadrado com correção de Yate's para avaliação das lesões macroscópicas. A significância estatística foi definida ao nível de 5%. Utilizou-se o programa GraphPad Prisma versão 5.0, para as análises dos dados.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Composição do extrato de café verde

Entre os compostos bioativos analisados o ácido clorogênico foi o composto majoritário, sendo seguido pela cafeína e trigonelina. O conteúdo de compostos fenólicos totais do extrato de café verde foi de aproximadamente 608,72 mg de EAG/100g de amostra. A atividade antioxidante analisadas por ABTS e DPPH apresentaram-se próximas. A Tabela 2 sumariza os resultados da composição do extrato de café verde.

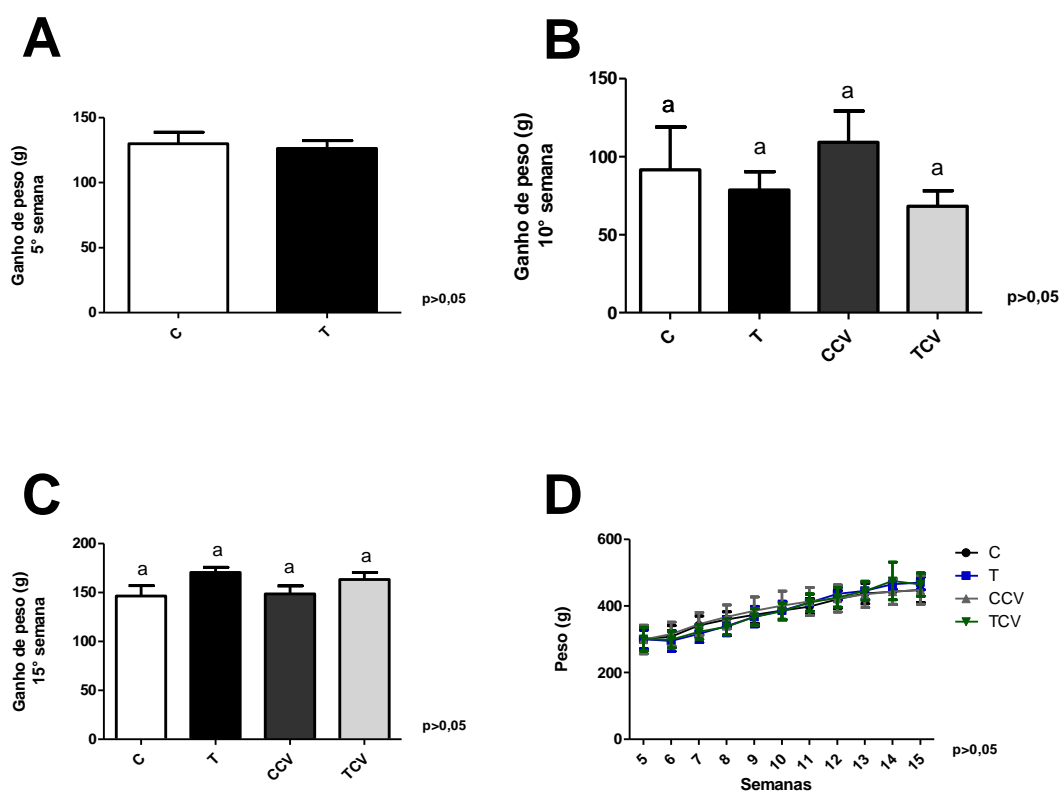
**Tabela 2** – Quantificação de compostos majoritários do extrato de café verde e a capacidade antioxidante.

<b>Análise*</b>	<b>Concentrações</b>
Ácido clorogênico (mg/mL)	5,78 ± 0,430
Cafeína (mg/mL)	3,73 ± 0,488
Trigonelina (mg/mL)	2,04 ± 0,086
Fenólicos totais (mg EAG/100 g)	608,72 ± 8,305
Atividade antioxidante ABTS (mmol Trolox/L)	105,69 ± 3,08
Atividade antioxidante DPPH (mmol Trolox/L)	108,1 ± 4,809

\*Análises realizadas em triplicata.

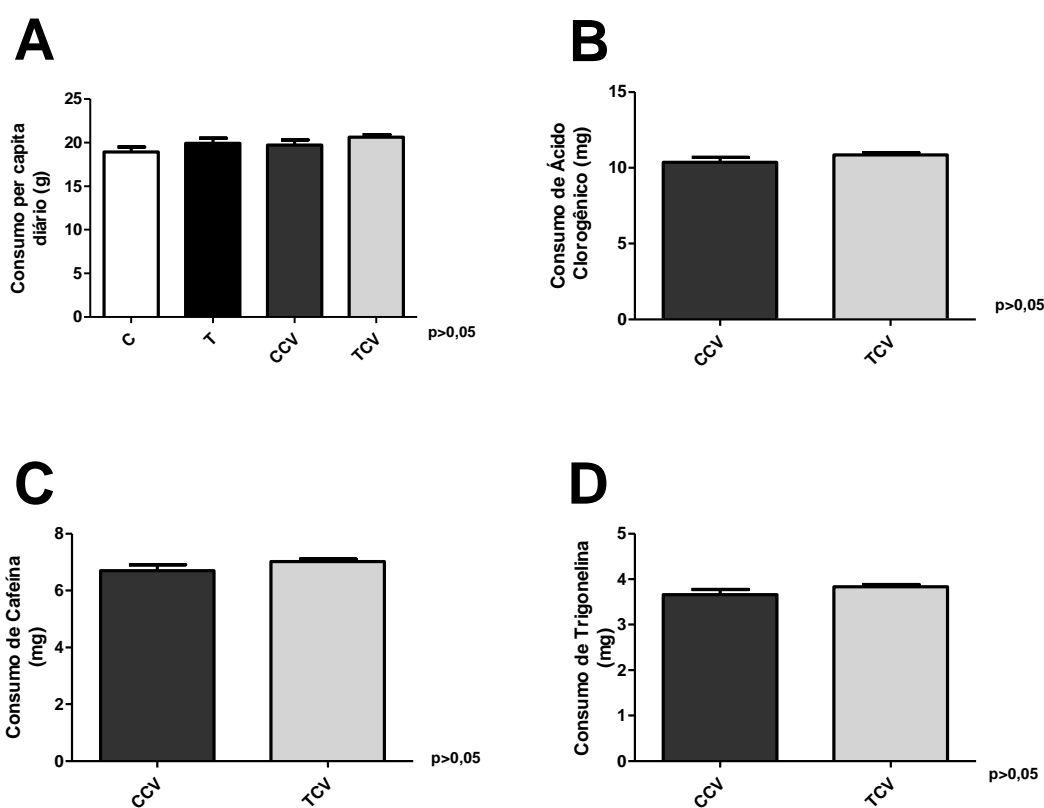
### 4.3.2 Evolução do peso e do consumo alimentar dos animais

O ganho de peso dos animais durante a fase de indução carcinogênica não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (Fig. 3A). O mesmo foi observado após o início da intervenção com extrato aquoso de café verde até a 15ª semana (Fig. 3B e 3C;  $p > 0,05$ ). A Figura 3D demonstra a evolução de peso semanal após início da intervenção até 15ª semana.



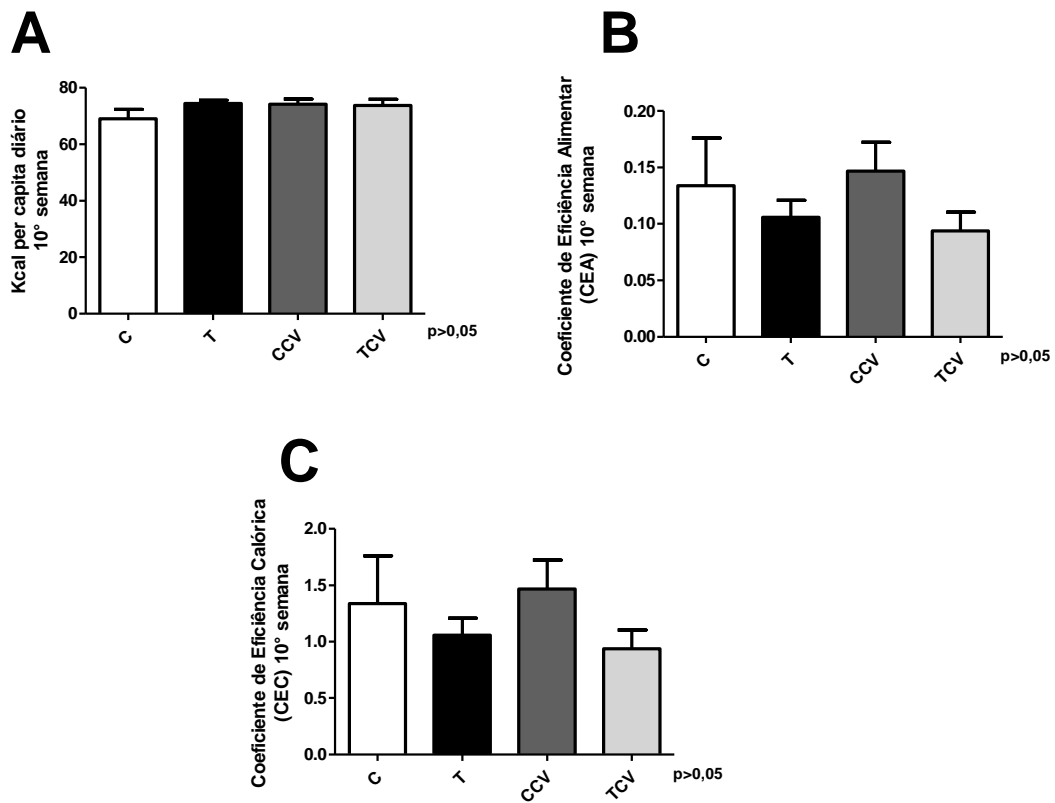
**Figura 3** – Ganho de peso dos animais durante per. Ganho de peso até a 5ª semana (n=48) (A), ganho de peso até a 10ª semana (n=16) (B), ganho de peso até a 15ª semana (n=32) (C), evolução do peso semanalmente (D).

O consumo alimentar *per capita* diário, bem como dos compostos bioativos do extrato aquoso de café verde (ácido clorogênico, Fig. 4B), cafeína, Fig. 4C e trigonelina, Fig. 4D) não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

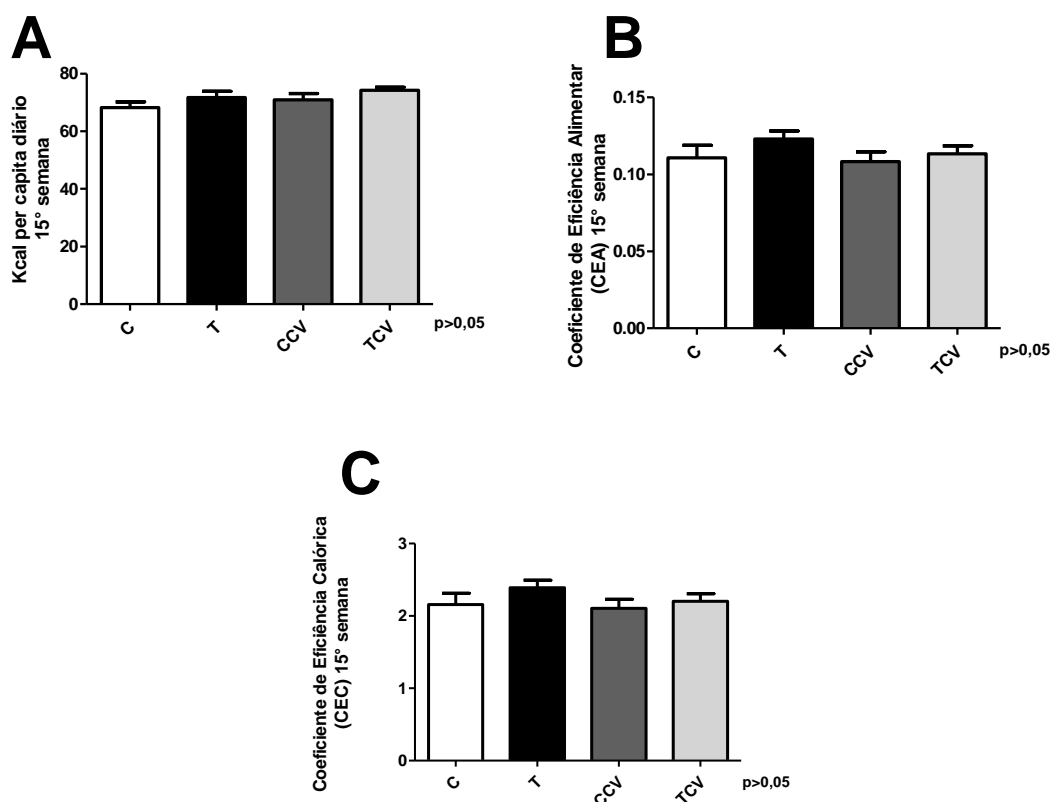


**Figura 4** – Gráficos de consumo alimentar. Consumo per capita diário (A), consumo diário de ácido clorogênico (B), consumo diário de cafeína (C), consumo diário de trigonelina (D).

Não foram observadas diferenças estatísticas no consumo calórico *per capita* diário, coeficientes de eficiência alimentar (CEA) e calórica (CEC) até a 10<sup>a</sup> semana (Fig. 5A, 5B e 5C, respectivamente) ou 15<sup>a</sup> semana de estudo (Fig. 6A, 6B e 6C, respectivamente).



**Figura 5** – Gráficos de kcal per capita, coeficiente de eficiência alimentar e calórica da 10ª semana de experimento. Kcal per capita diário até a 10ª semana (A), coeficiente de eficiência alimentar até a 10ª semana (CEA) (B) e coeficiente de eficiência calórica até a 10ª semana (CEC) (C).



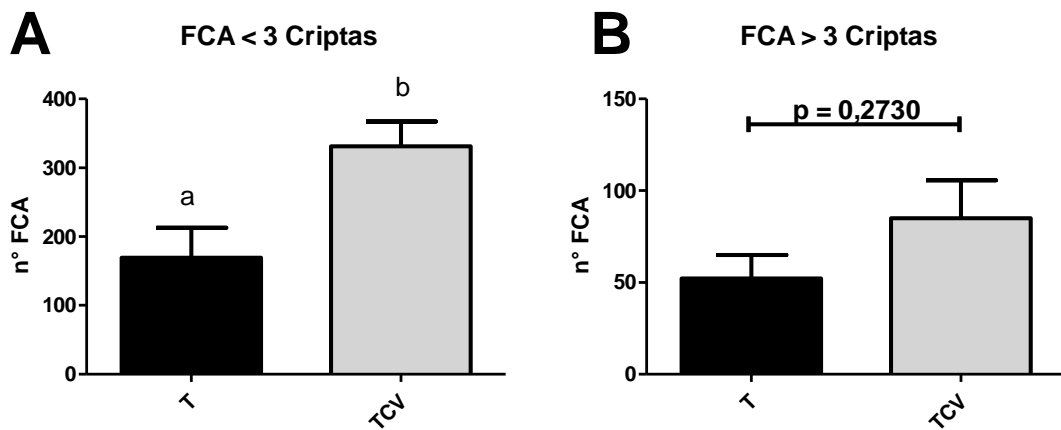
**Figura 6** – Gráficos de kcal per capita, coeficiente de eficiência alimentar e calórica da 15° semana de experimento. Kcal per capita diário até a 15° semana (A), coeficiente de eficiência alimentar até a 15° semana (CEA) (B) e coeficiente de eficiência calórica (CEC) (C).

#### 4.3.3 Contagem de FCA e alterações intestinais.

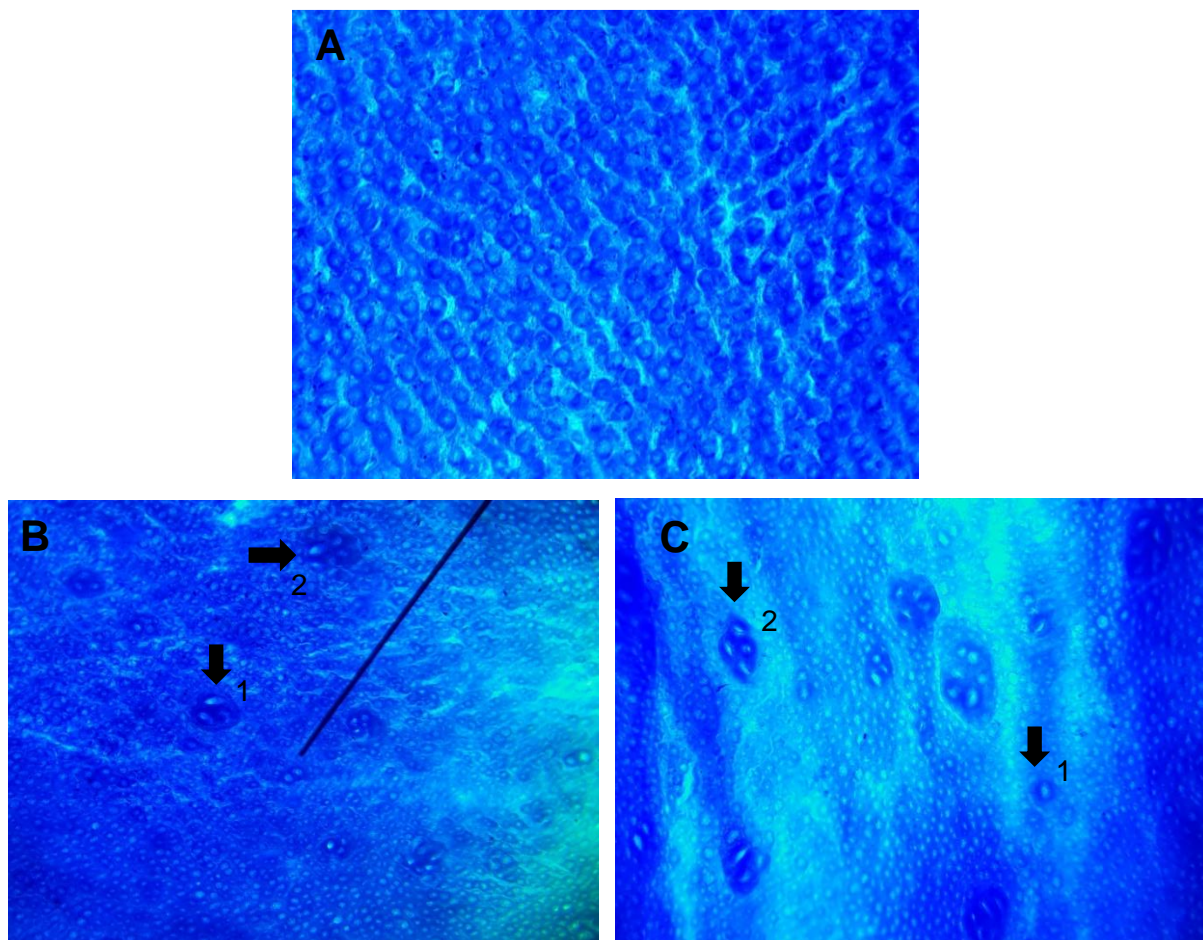
A contagem dos focos de criptas aberrantes (FCA) e as alterações intestinais estão apresentadas na Figura 7 e Tabela 3, respectivamente. Apenas os grupos induzidos à carcinogênese colorretal apresentaram FCA e lesões macroscópicas.

A contagem de FCA separa os FCA em até 3 criptas aberrantes (Fig. 7A) e focos com mais de 3 criptas aberrantes (Fig. 7B). A confirmação das lesões foi comprovada no grupo TCV, que apresentou contagem de FCA < 3 significativamente maior que o grupo T (Fig. 7A). A imagem B mostra que a contagem de FCA > 3, entre T e TCV, não apresentou diferença estatística. A Figura 8 ilustra os diferentes tipos de focos de criptas aberrantes em região do intestino.





**Figura 7** – Gráficos da contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) realizada em intestino grosso de ratos Wistar na 10ª semana de experimento. Contagem de focos de criptas aberrantes com menos de 3 criptas (A), contagem de focos de criptas aberrantes com mais de 3 criptas (B). Letras diferentes significam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste t.



**Figura 8** – Fotomicrografias da mucosa intestinal de ratos submetidos à carcinogênese colorretal. A: Aparência de intestino saudável. B: Área de intestino de animais do grupo T (grupo com indução de câncer, sem extrato de café verde) com focos com < 3 criptas aberrantes (1) e focos com > 3 criptas aberrantes (2). C: Área de intestino de animais do grupo TCV (grupo com indução de câncer e com extrato de café verde) contendo focos com < 3 criptas aberrantes (1) e focos com > 3 criptas aberrantes (2). (Aumento: 4x. Corante: azul de metileno)

A Tabela 3 apresenta as alterações intestinais neoplásicas e de crescimento na 15ª semana de experimento. A análise mostrou que a ingestão diária do extrato aquoso de café verde não influenciou nos tipos de lesões encontradas, porém, ressalta-se que animais tratados com esse extrato tendem a apresentar menor número de lesões, principalmente as alterações neoplásicas.

**Tabela 3** – Alterações intestinais neoplásicas e de crescimento na 15ª semana de experimento.

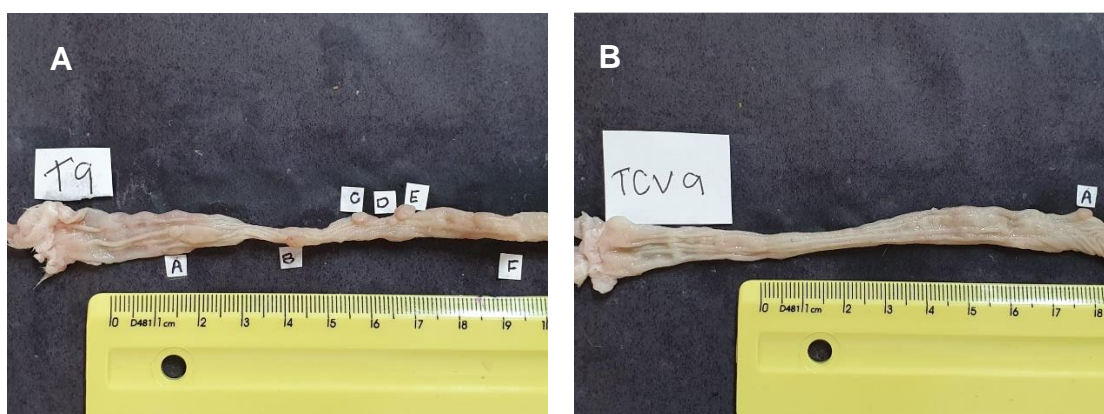
Grupo	Lesões Macroscópicas	Alterações Neoplásicas		P valor*	Alterações de Crescimento		P valor*
		Malignas	Benignas		Hiperplasias linfócitas	Displasias	
T	19	7	3	0,8365	3	5	0,6873
TCV	12	4	1		2	4	
% redução**	36,84	42,84	66,67		33,33	20	

\*p valor indicado pelo teste qui-quadrado com correção de Yate's.

\*\* Percentual de redução do grupo TCV em relação ao grupo T.

Alguns tipos de lesões diferentes foram encontrados, sendo que as alterações neoplásicas malignas foram adenocarcinomas tubular colorretal e carcinomas *in situ*, e benignas os adenomas. Além das apresentadas na tabela, também foi encontrado no grupo TCV uma placa de peyer, que são aglomerados de nódulos linfáticos, que tem como função principal a produção de imunoglobulinas (SAKAI et al., 2019).

A Figura 9 mostra um exemplo de intestino de cada grupo com lesão macroscópica, em que o grupo que recebeu extrato de café verde (TCV) apresentou apenas uma lesão, enquanto o grupo T apresentou 6 lesões.

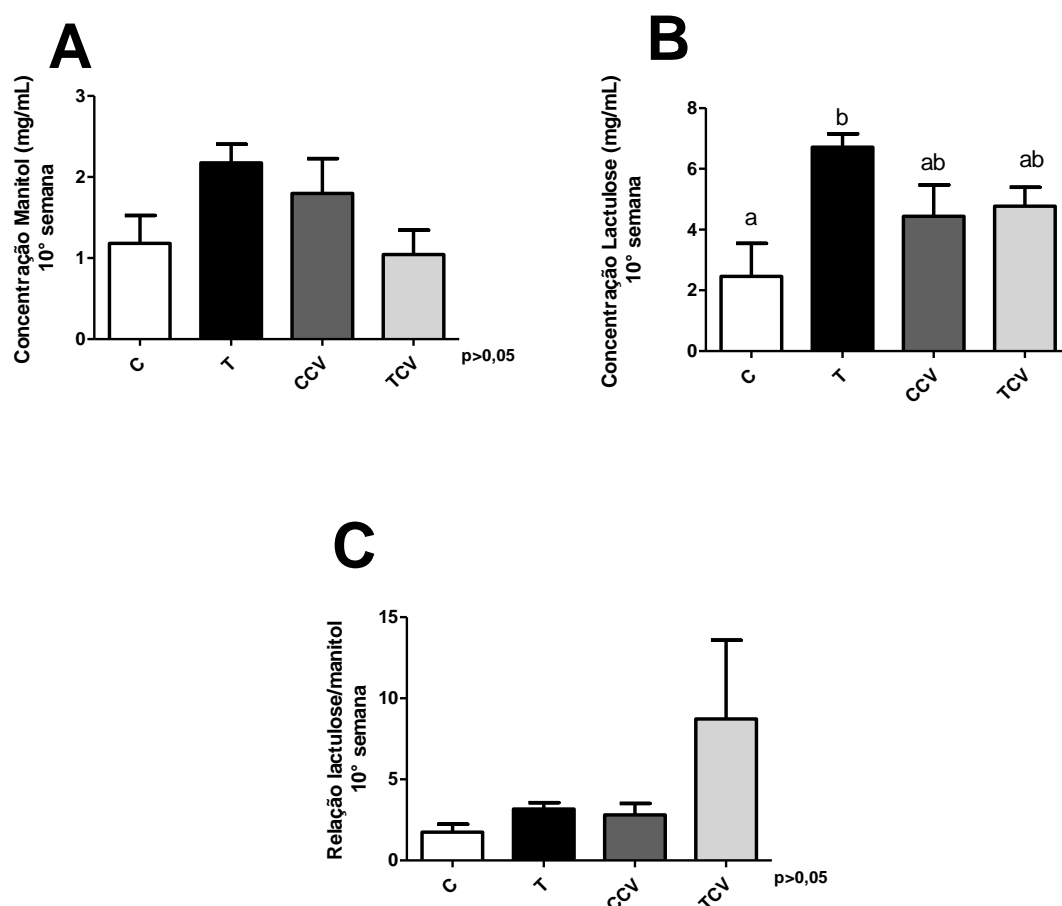


**Figura 9** – Aparência das lesões macroscópicas em intestino de ratos Wistar induzidos à carcinogênese colorretal após período de ingestão com extrato aquoso de café verde. A: Intestino grosso animal do grupo T (com indução do câncer e sem extrato de café verde) com 6 lesões macroscópicas (A= hiperplasia; B= adenocarcinoma tubular colorretal; C= carcinoma *in situ*; D= adenoma; E= displasia;

F= displasia). B: Intestino grosso animal do grupo TCV (com indução do câncer e com extrato de café verde) com 1 lesão (A= adenocarcinoma tubular colorretal).

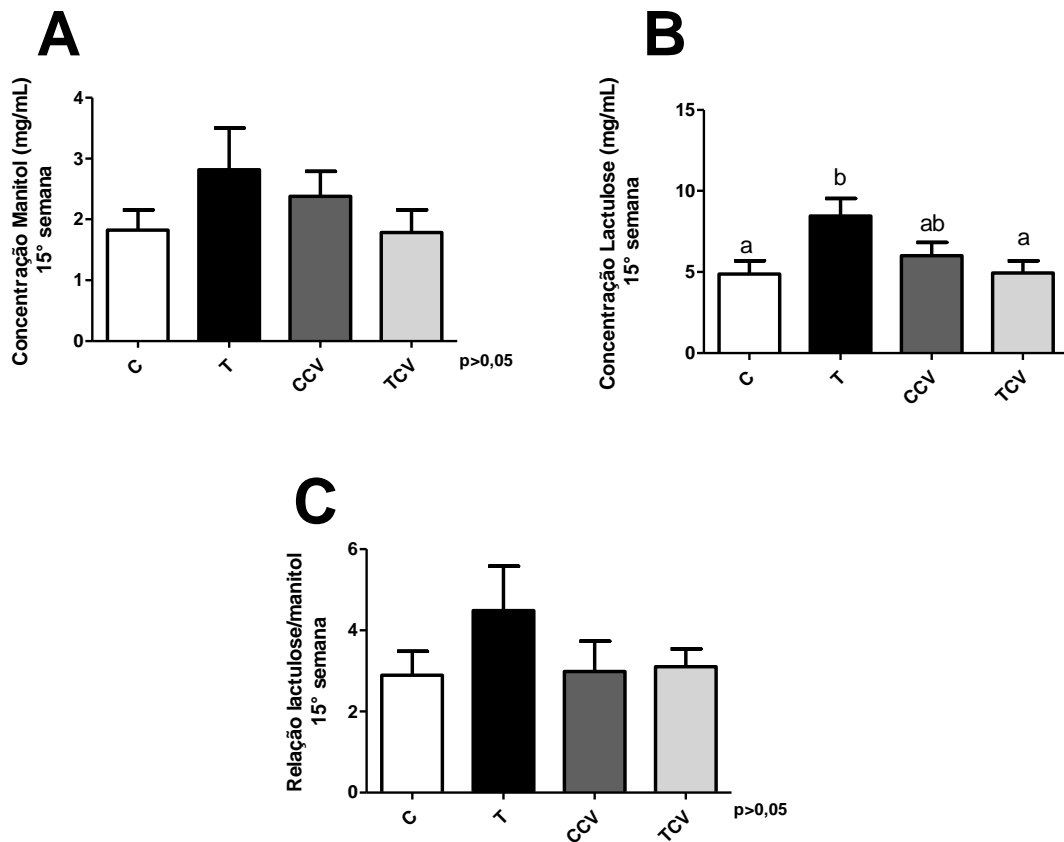
#### 4.3.4 Permeabilidade intestinal

Não houve diferença significativa na excreção de manitol na 10ª semana de estudo (Fig. 10A), porém observou-se maior excreção de lactulose no grupo T ( $p < 0,05$ ), comparado ao grupo C (Fig. 10B). Semelhante ao período anterior, na 15ª semana, observou-se maior excreção do composto lactulose no grupo T ( $p < 0,05$ ), em comparação aos grupos C e TCV (Fig. 11B). Não foram verificadas diferenças estatísticas para a relação lactulose/manitol nos momentos analisados (Figura 10C e 11C).



**Figura 10** – Concentração de manitol e lactulose na urina de 24 horas e a relação lactulose/manitol da 10ª semana. Excreção de manitol da 10ª semana (A), Excreção de lactulose da 10ª semana (B), relação lactulose/manitol da 10ª semana (C). Letras

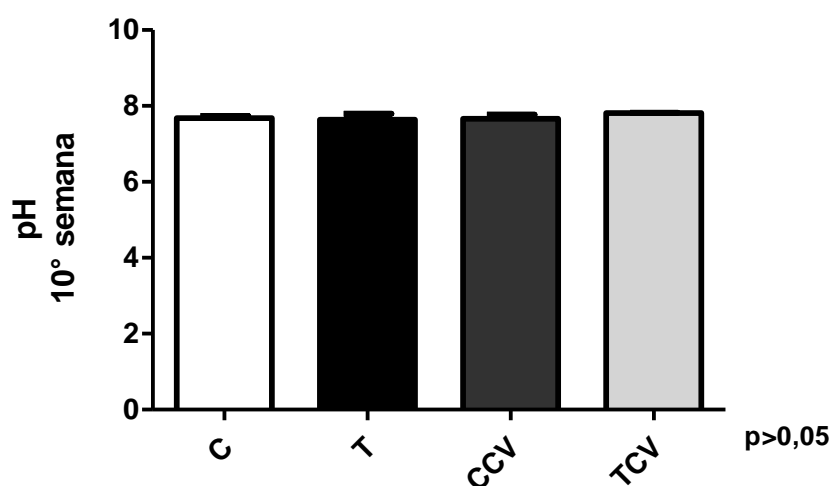
diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



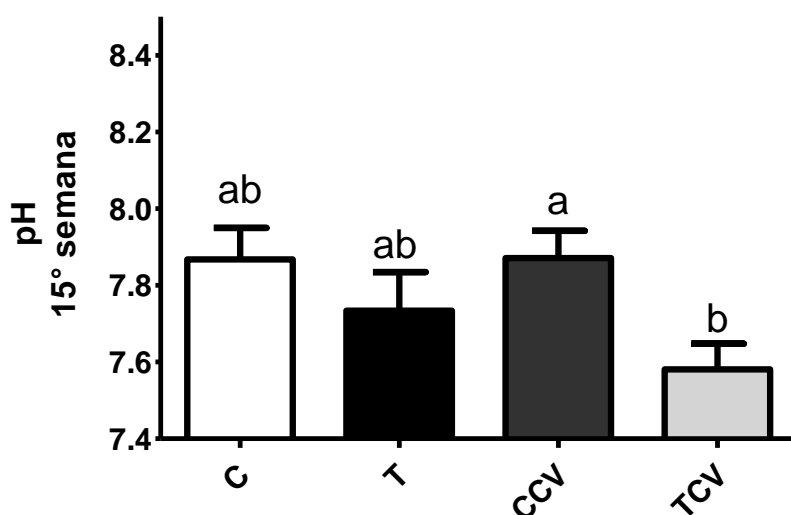
**Figura 11** – Concentração de manitol e lactulose na urina de 24 horas e a relação lactulose/manitol da 15ª semana. Excreção de manitol da 15ª semana (A), Excreção de lactulose da 15ª semana (B), relação lactulose/manitol da 15ª semana (C). Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.5 pH intestinal

O pH intestinal analisado utilizando o conteúdo cecal dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos na 10ª semana de experimento (Fig. 12). No entanto, observou-se ligeiro decréscimo no pH no grupo TCV ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo CCV na 15ª semana de experimento (Fig. 13).



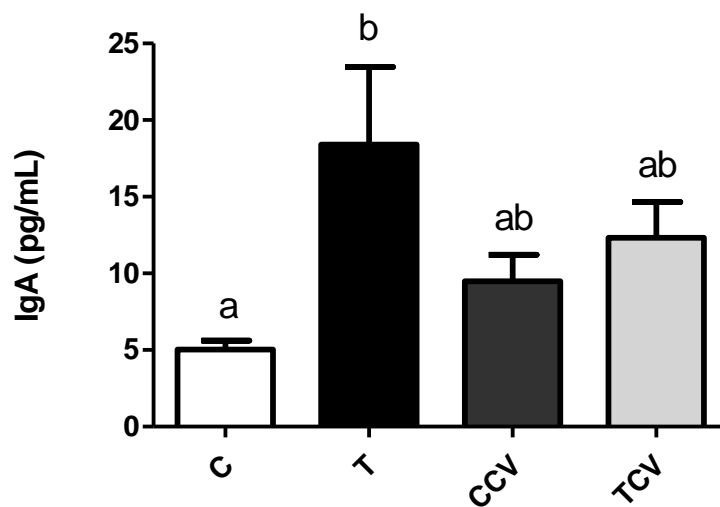
**Figura 12** – Valores de pH intestinal de ratos Wistar na 10ª semana (n=4).



**Figura 13** – Valores de pH intestinal de ratos Wistar na 15ª semana (n=8). Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.6 Determinação de IgA

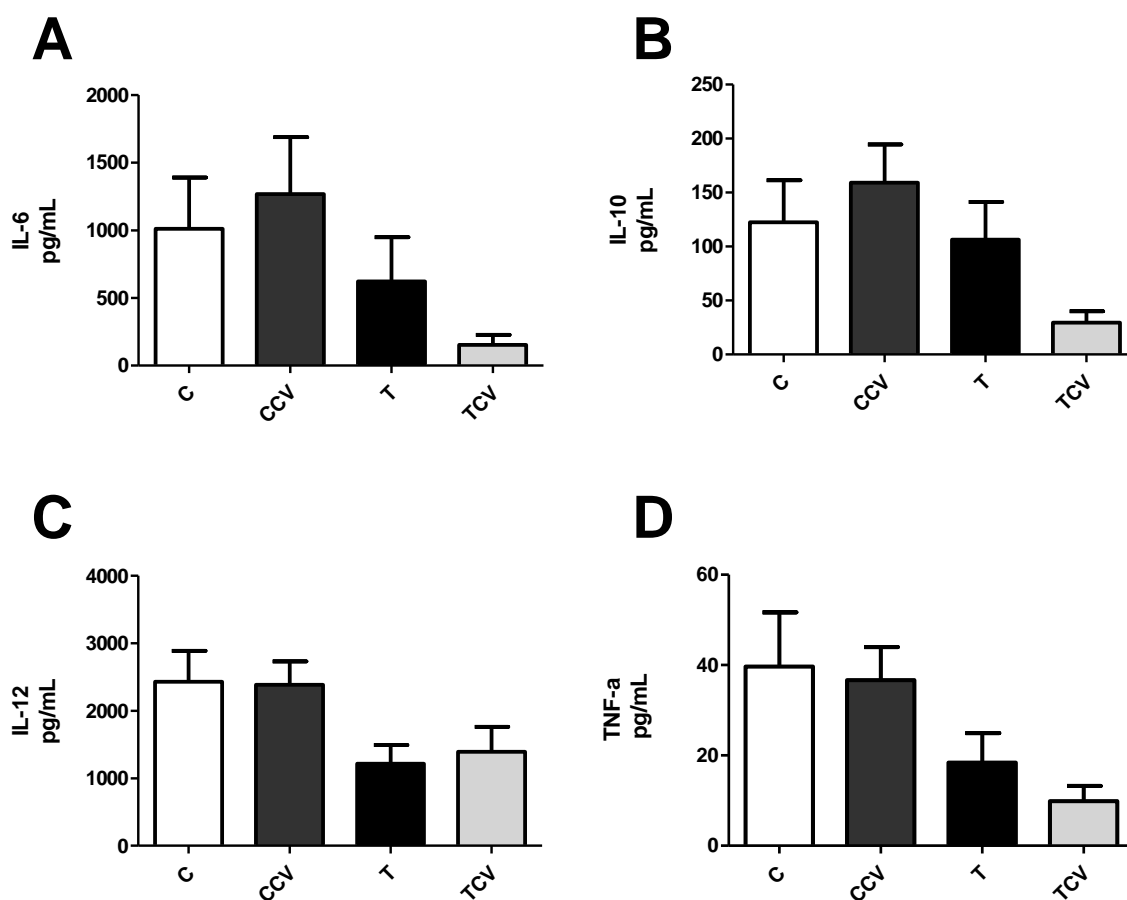
A análise de IgA secretora foi realizada apenas na 15ª semana utilizando o conteúdo cecal. Houve expressivo aumento de IgA secretora no grupo T, em relação ao grupo C. Já, os grupos que receberam extrato de café verde apresentaram valores significativamente iguais tanto ao grupo C quanto ao grupo T (Fig. 14).



**Figura 14** – Concentração de IgA secretora (pg/mL) no conteúdo cecal de ratos Wistar na 15ª semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.7 Quantificações de biomarcadores inflamatórios

Figura 15 resume as concentrações dos biomarcadores inflamatórios em amostras sanguíneas de animais tratados ou não com extrato de café verde e induzidos ou não a carcinogênese colorretal. Os níveis das citocinas analisadas, de IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12 (C) e TNF- $\alpha$  (D), não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

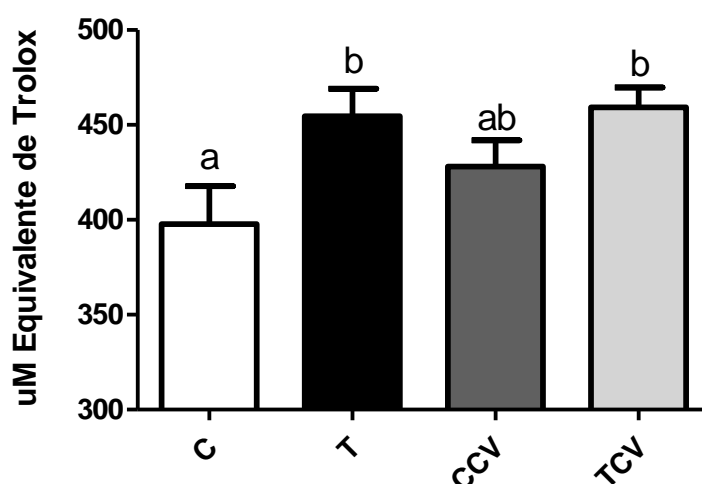


**Figura 15** – Concentração (pg/mL) de IL-6 (A), IL-10 (B), IL-12 (C) e TNF- $\alpha$  (D) sanguíneos de ratos Wistar na 15<sup>a</sup> semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.8 Determinação da capacidade antioxidante total sanguínea

No presente estudo, evidenciou-se maior capacidade antioxidante total sanguínea nos grupos com indução de CCR (T e TCV), em relação ao grupo C.





**Figura 16** – Determinação da capacidade antioxidante total ( $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox) em amostras sanguíneas de animais na 15ª semana. Letras diferentes significam diferença estatística, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 Discussão

O café verde é o grão maduro, não torrado ou processado. Esse alimento se destaca pelo potencial nutricional, que fornecem efeitos benéficos a saúde devido aos seus compostos bioativos, como antioxidante e anti-inflamatório (BHANDARKAR et al., 2019; SANLIER; ATIK; ATIK, 2019). Diversos compostos bioativos foram identificados no café verde, tais como polifenóis, tocoferóis e fitoesteróis (DONG et al., 2021). Contudo, os compostos majoritários são o ácido clorogênico, a cafeína e a trigonelina (MOJICA et al., 2018). Em comparação ao café torrado, o café verde apresenta concentrações superiores de ácido clorogênico e trigonelina e menores de cafeína, isso acontece por causa do processo de torrefação na qual as altas temperaturas degradam o ácido clorogênico e a trigonelina (ACIDRI et al., 2020; BHANDARKAR et al., 2019; MUÑOZ et al., 2020b). Desse modo justifica-se a utilização do café verde, variedade conilon, como fonte de compostos bioativos. Ainda, destaca-se que a obtenção do extrato foi feita de modo convencional, de modo a se aproximar ao preparo doméstico.

A diferença no teor de compostos bioativos varia também entre as espécies de café. Enquanto o arábica (*Coffea arabica*) apresenta um maior teor de açúcares totais,

ofertando uma superioridade sensorial, ao passo que o café conilon (*Coffea canephora*) fornece maior teor de compostos fenólicos, ácido clorogênico e cafeína, conferindo a esta variedade uma maior capacidade antioxidante (LEMOS et al., 2020).

Os compostos fenólicos representam um grupo diverso de substâncias, sendo a principal classe de antioxidantes naturais, dentre elas os ácidos fenólicos, os flavonóides e os lignanos, que são divididos desta forma de acordo com a cadeia de carbonos (MIKOŁAJCZAK; TAŃSKA; OGRODOWSKA, 2021; SCHERER et al., 2013), são compostos importantes na redução do estresse oxidativo (JESZKA-SKOWRON; STANISZ; DE PEÑA, 2016). O presente estudo analisou o teor de compostos fenólicos no extrato aquoso de café verde, encontrando 608,72 mg de EAG/100 g de extrato, enquanto outros estudos obtiveram resultados inferiores, como 14,4 mg EAG/100 g de amostra no trabalho de Dong et al. (2021), 30 mg EAG/100 g no estudo de Wongsa et al. (2019) e 317,4 mg EAG/100 g de extrato aquoso no estudo de Montenegro et al. (2021). As diferenças entre os estudos podem ser explicadas pela variabilidade genética, e variações dos ambientes que podem influenciar na composição química do café, como condições agrônômicas de cultivo, colheita em diferentes tipos de maturação, época de colheita, local de cultivo e a adubação (BARBOSA et al., 2019; LEMOS et al., 2020). A forma de extração também pode ser fator determinante para tal diferença, como por exemplo extrações assistidas por micro-ondas, ultrassom e até mesmo extração por líquido pressurizado (DONG et al., 2021).

Neste trabalho esses compostos bioativos foram quantificados no extrato de café verde produzido, os resultados foram apresentados na Tabela 2, sendo que composto majoritário do café verde foi o ácido clorogênico com 5,781 mg/mL de extrato, seguido da cafeína com 3,739 mg/mL e da trigonelina com 2,041 mg/mL. Outros estudos também identificaram maior concentração de ácido clorogênico em extratos de café verde, sendo seguidos de cafeína e trigonelina (LEMOS et al., 2020; MUÑOZ et al., 2020b).

No presente estudo, foram realizados três métodos para avaliar a capacidade antioxidante do extrato de café verde. A avaliação antioxidante não deve se basear em apenas uma metodologia já que os antioxidantes agem de maneiras diferentes, se fazendo necessário outros métodos para se caracterizar um composto ou amostra como antioxidante (PASTOR et al., 2020). As metodologias são semelhantes, onde

normalmente um radical sintético é produzido e eliminação ou neutralização deste pela amostra é medido em um espectrofotometro UV/Vis (REZENDE; NOGUEIRA; NARAIN, 2018). No caso do método de DPPH, onde a substância antioxidante doa átomos de hidrogênio após contato com o radical a forma reduzida deste é obtida, a hidrazina, juntamente com mudança simultânea a coloração (SCHERER; GODOY, 2009). Já no método ABTS, a capacidade antioxidante da amostra é medida pela habilidade da mesma em neutralizar o radical 2,2'-Azino-bis, perdendo sua coloração (ABTS) (RE et al., 1999).

Em relação ao método ABTS, foi encontrado o valor de 105,690 mmol Eq. Trolox/L enquanto outro estudo encontrou valor de 14.790,0 mmol de Eq. Trolox/L (MONTENEGRO et al., 2021). Essa diferença pode ser justificada pelo método de extração, na qual a extração realizada por Montenegro et al., (2021) foi assistida por micro-ondas, sendo capaz de extrair uma maior concentração de compostos bioativos, como por exemplo o ácido clorogênico que apresentou 18,52 mg/mL de extrato aquoso. O mesmo observa-se para o método DPPH, em que estes últimos autores encontraram 6.680,0 mmol ETrolox/L, frente à concentração de 108,100 mmol Eq. Trolox/L do presente estudo. Outro estudo, utilizando extrato aquoso de café verde encontrou os seguintes valores, para o método DPPH 199,7 mmol Eq. Trolox/L e para ABTS 220,7 mmol Eq. Trolox/L (ACIDRI et al., 2020). Segundo esse último autor, os valores encontrados indicam a alta capacidade antioxidante da amostra, portanto, o presente estudo tem achados que também indicam que o extrato aquoso de café verde utilizado neste estudo apresenta elevada capacidade antioxidante (DONG et al., 2021; MONTENEGRO et al., 2021; WONGSA et al., 2019).

O ganho de peso e consumo dos animais não apresentaram diferença estatística ao longo do período experimental, o que sugere que a indução do câncer colorretal e a intervenção com extrato de café verde não influenciaram nesses quesitos. Estudos com um tempo experimental maior podem gerar diferenças no ganho de peso e consumo alimentar, devido à caquexia associada ao câncer. Desse modo, o tempo do estudo pode ser um ponto para explicar a semelhança dos grupos para os parâmetros de peso e consumo.

O desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) envolve uma série de alterações patológicas, desde lesões microscópicas na mucosa, como os focos de criptas

aberrantes (FCA), até tumores malignos. Os FCA são considerados lesões precoces e precursoras do CCR, tendo sua contagem como biomarcador para detecção do fator de risco de desenvolver CCR (HURLSTONE; CROSS, 2005; RODRIGUES et al., 2002). A contagem de FCA feita na 10ª semana de experimento teve como objetivo comprovar o início do processo de carcinogênese. Neste momento, diferença estatística foi observada na contagem de FCA com < 3 criptas onde o grupo TCV apresentou valores maiores chegando a um aumento de 51,1% nesse tipo de FCA. Numericamente o mesmo acontece para FCA > 3 criptas, porém sem diferença estatística. Isso pode indicar que o tratamento com extrato de café verde aumentou as lesões iniciais (FCA), porém ao analisar esses dados de lesões iniciais com as lesões macroscópicas pode-se observar que o grupo TCV apresentou uma redução de 36,84% das lesões macroscópicas em comparação com o grupo T.

Estudos que relacionam o extrato café verde com o câncer colorretal e/ou contagem de FCA em modelo animal são escassos. Contudo, na literatura científica são encontrados estudos utilizando o composto majoritário, o ácido clorogênico (RUAN et al., 2014; Z. ZHANG et al., 2017). Sugere-se que um dos efeitos do ácido clorogênico sobre a carcinogênese seja a atenuação da ativação metabólica e o aumento do combate ao estresse oxidativo, devido à sua ação antioxidante (MATSUNAGA et al., 2012). Em um estudo, utilizando-se ácido clorogênico (0,1%) na dieta de modelo animal de carcinogênese colorretal por 20 semanas não identificou alterações significativas na contagem de FCA no intestino (PARK, Hea Jin et al., 2010). No estudo de Park et al. (2010), observa-se que o número elevado de FCA levou ao maior número de tumor, mas no presente trabalho foi observado que, apesar do elevado número de FCA os números de tumores desenvolvidos foram menores, isso porque os FCA são lesões iniciais do CCR podendo ter seu desenvolvimento interrompido ou diminuído. Em outro estudo com ácido clorogênico e CCR associou o efeito quimiopreventivo do tratamento com ácido clorogênico como um bloqueador ainda na fase de iniciação, relacionando essa atividade às suas propriedades antioxidantes e a inibição das enzimas de Fase I (MATSUNAGA et al., 2012).

Em relação as alterações intestinais neoplásicas e de crescimento, o grupo TCV apresentou redução de 42,84% das alterações neoplásicas malignas e 66,67% das benignas em relação ao grupo T. Ainda, o grupo TCV reduziu em 36,84% das lesões

macroscópicas totais. O presente estudo mostrou que o tratamento com extrato de café verde reduziu em 33,33% das hiperplasias e 20% das displasias. Apesar desses resultados não terem apresentado diferença estatística, clinicamente esses achados são relevantes, uma vez que um maior número de lesões neoplásicas e as características dessas lesões podem estar associadas ao prognóstico negativo do CCR. O câncer colorretal é o resultado de alterações da mucosa intestinal que leva ao descontrole de hiperplasias e displasias por parte dos colonócitos, assim a modulação das alterações neoplásicas e de crescimento podem diminuir o risco de desenvolvimento de CCR (REIS; CONCEIÇÃO; PELUZIO, 2019). Destaca-se que esses resultados podem ser aclarados com a administração de extrato de café verde superior ao do presente estudo, ou seja, superior a 10 semanas de intervenção.

Ao analisarmos os resultados apresentados neste trabalho com o discutido por Matsunaga et al., (2012), de que o ácido clorogênico poderia agir como bloqueador da iniciação, pode-se sugerir que o efeito observado é de não bloqueador e sim um agente redutor na fase posterior aos FCA, visto que o número de FCA não diminuiu, mas o desenvolvimento de lesões macroscópicas, alterações neoplásicas e de crescimento foram minimizados, atenuando o desenvolvimento da doença.

O pH intestinal do grupo CCV foi maior do que no grupo TCV estatisticamente, no entanto, essa diferença na alteração do pH foi muito baixa, já que ambos receberam o extrato de café verde esperava-se um pH mais baixo nos dois grupos em comparação com T e C.

A disfunção da integridade da barreira é comum em pacientes com CCR e leva ao aumento da permeabilidade intestinal, que está relacionada com a carga das lesões neoplásicas, então a maior integridade da barreira da mucosa intestinal pode inibir o crescimento tumoral (SANDOVAL-RAMÍREZ et al., 2020). Neste contexto, o manitol e lactulose são analisados para avaliar a permeabilidade intestinal. O manitol é um monossacarídeo e sua análise aponta a concentração da absorção de moléculas via transcelular, e a lactulose é um dissacarídeo que sua quantificação indica o grau de absorção de moléculas grandes via paracelular (RESENDEZ et al., 2015). No presente estudo, apenas a lactulose do controle positivo (grupo T) apresentou aumento significativo em relação aos demais grupos. O grupo com indução e intervenção com café verde (TCV) manteve os valores estatisticamente iguais ao grupo considerado

saudável (C), sugerindo que o extrato de café verde contribui para a integridade da barreira intestinal. Novos estudos nessa área são necessários para confirmar os achados do presente estudo, assim sugere-se a análise da expressão de proteínas constituintes das “tight junctions”, como as proteínas ZO-1 e ocludinas.

A principal imunoglobulina encontrada em secreções exócrinas é a imunoglobulina A (IgA), que participa da tumorigênese por meio da resposta imune adaptativa, e possui efeito protetor ao impedir que um agente invasor penetre o epitélio (SI et al., 2021). Sugere-se que a IgA será secretada de forma mais intensa quando houver alterações na mucosa (BHASKARA et al., 2021; SI et al., 2021). No presente estudo, o grupo com maior concentração de IgA foi o grupo T, ao passo que os grupos que receberam extrato de café verde foram significativamente iguais tanto ao grupo T (com câncer) quanto ao grupo C (saudável). Esses resultados indicam que o extrato de café verde foi capaz de reduzir as alterações na mucosa causadas pela carcinogênese, confirmando os resultados de permeabilidade intestinal.

Os estudos mostram que existem dois mecanismos principais para a atuação anticâncer da trigonelina, atuando de forma a prevenir a invasão celular, que é uma forma significativa da proliferação de células cancerígenas (HU et al., 2019), e outro é pela regulação do fator de transcrição Nrf2, que é ativado quando ocorre invasão celular, entretanto as células cancerosas também apresentam esse fator (BOETTLER et al., 2011). O ácido clorogênico, por suas atividades antioxidantes, pode ter papel na quimioprevenção já que o estresse oxidativo e os danos ao DNA estão envolvidos na carcinogênese colorretal (PARK, Hea Jin et al., 2010). A cafeína também está associada a proteção contra danos celulares, mutações do DNA e também inflamação através da modulação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-2, bem como a atuação no microbioma intestinal, sendo apontada como influente na patogênese e prognóstico do CCR (CUI et al., 2020).

Além das alterações do microambiente tumoral, também foram analisadas alterações sistêmicas, relacionados aos processos inflamatórios e oxidativos. O CCR está associado ao aumento dos níveis séricos de várias citocinas, tais como as interleucinas (IL) 1, 6, 10 e 12, o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (KLAMPFER, 2011; LITTLE et al., 2017). Em um estudo, identificou-se que a menor

displasia e incidência de lesões neoplásicas em ratos tratados com compostos fenólicos está relacionado com a diminuição da expressão de biomarcadores inflamatórios, como a interleucina (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )(REIS, Sandra Aparecida Dos; DA CONCEIÇÃO; PELUZIO, 2019).

Contudo, no presente estudo não foram observadas alterações estatísticas no teor de citocinas analisadas, entre os grupos experimentais. Outras interleucinas tem sido estudadas como potencial alvo terapêutico anticâncer, como é o caso da IL-1 $\beta$ , que é uma citocina pró-inflamatória que induz a expressão de TNF $\alpha$ , IL-6, IL8, IL-17, COX-2 e PGE2, todos mediadores pró-inflamatórios que promovem o crescimento de células tumorais (CZAJKA-FRANCUZ et al., 2020; KLAMPFER, 2011). O estudo de MIRANDA et al., (2018) com pacientes de CCR indicou elevação dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL8. Outra citocina que pode ser um alvo investigativo é o TGF- $\beta$ , que exerce função dupla no processo de carcinogênese, suprimindo tumores em carcinomas iniciais e promovendo metástase em tumores agressivos, e a cafeína se mostrou capaz de bloquear a elevação de TGF- $\beta$  de maneira dependente de concentração (CUI et al., 2020).

O estresse oxidativo é a condição em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes não estão em níveis suficientes para compensar os danos por elas causados (RIBEIRO et al., 2018; WU, Rong et al., 2017). A capacidade antioxidante total é um indicador do estresse oxidativo. No presente trabalho verificou-se que os maiores valores foram encontrados nos grupos como carcinogênese induzida (T e TCV). Muitos dos efeitos anticarcinogênicos do café verde são atribuídos ao ácido clorogênico, porém a cafeína também pode ser importante nesse processo, visto que a cafeína tem atividade antioxidante relevante protegendo membranas do estresse oxidativo (CUI et al., 2020). Portanto, estudos analisando os efeitos do café verde na membrana intestinal podem trazer resultados mais conclusivos relacionando o estresse oxidativo, câncer colorretal e o extrato de café verde. Ainda, a quantidade de café verde ofertada deve ser mais estudada, uma vez que não foi capaz de promover diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de antioxidantes entre o grupo com câncer (T) e o grupo com câncer que recebeu café verde (TCV). Porém, levanta-se a hipótese de que o grupo TCV apresentou teores maiores de antioxidantes sistêmicos devido a uma tentativa do

organismo do animal em reagir frente à agressão das lesões.

De acordo com os achados do presente trabalho, a atuação do extrato de café verde levanta hipóteses interessantes sobre a diminuição do risco de desenvolvimento do câncer colorretal, por meio da atuação de seus compostos bioativos no microambiente da lesão neoplásica. Além disso, este trabalho abre possibilidade de novos estudos nesse sentido, utilizando o café verde e seus compostos bioativos como possíveis auxiliares na diminuição do risco de desenvolvimento câncer colorretal, visto que o estudo e resultados são inéditos e servirão de base para estudos futuros e para confirmar sua atuação.

#### 4.5 Conclusão

Este estudo quantificou os compostos majoritários do extrato de café verde, sendo o ácido clorogênico é o composto predominante, bem como, apontou que o extrato apresenta elevada capacidade antioxidante.

O extrato de café verde contribuiu para a integridade da barreira intestinal e reduziu as alterações da mucosa. Além disso, a suplementação com extrato de café verde reduziu a progressão do câncer colorretal.

Em relação as análises sistêmicas, o presente estudo não evidenciou efeitos significativos sobre biomarcadores inflamatórios. Contudo esse estudo abre possibilidade para novos estudos, onde estudar a dose, o tempo e de forma local pode ser importante para trazer resultados comprovadores, já que o café verde parece atuar localmente e não de forma sistêmica.

#### 4.6 Referências bibliográficas

ACIDRI, Robert et al. Phytochemical profile and antioxidant capacity of coffee plant organs compared to green and roasted coffee beans. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 1–18, 2020.

BAEZA, Gema et al. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. **Food Research International**, v. 62, p. 1038–1046, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.035>>.

BARBOSA, Mayara de Souza Gois et al. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, v. 292, p. 275–280, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.072>>.



BHANDARKAR, Nikhil S. et al. Green coffee ameliorates components of diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. April, p. 141–149, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.003>>.

BHASKARA, Venugopal et al. Efficient production of recombinant secretory IgA against *Clostridium difficile* toxins in CHO-K1 cells. **Journal of Biotechnology**, v. 331, n. February, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.02.013>>.

BIRD, Ranjana P.; GOOD, Carolyn K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 395–402, 2000.

BOETTNER, Ute et al. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 426–440, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.03.011>>.

CASTRO, A. C.C.M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48–57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.153>>.

COUTO, Cinthia Vidal Monteiro da Silva et al. **Juçara supplementation (*Euterpes edulis Martius*) reduces oxidative stress enzyme expression in the colorectal mucosa of carcinogenesis-induced rats.** . [S.l: s.n.], 2019.

CUI, Wen Qi et al. Caffeine and its main targets of colorectal cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 12, n. 2, p. 149–172, 2020.

CZAJKA-FRANCUZ, Paulina et al. Serum cytokine profile as a potential prognostic tool in colorectal cancer patients – one center study. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 25, n. 6, p. 867–875, 2020.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 23, p. 15177–15186, 2011.

DE SOUSA MORAES, Luís Fernando et al. Anthocyanins/anthocyanidins and colorectal cancer: What is behind the scenes? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 59–71, 2019.

DONG, Wenjiang et al. Ultrasonics Sonochemistry Comparison of the effect of extraction methods on the quality of green coffee oil from Arabica coffee beans : Lipid yield , fatty acid composition , bioactive components , and antioxidant activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 74, p. 105578, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105578>>.

DOS REIS, Schalana Oliveira et al. Juçara (*Euterpe edulis Mart.*) Supplementation Reduces Aberrant Crypt Foci and Increases SOD1 Expression in the Colorectal Mucosa of Carcinogenesis-Induced Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1649437>>.

GALEONE, Carlotta et al. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of case-control studies. **Cancer Causes and Control**, v. 21, n. 11, p. 1949–1959, 2010.

GOUTHAMCHANDRA, K. et al. Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 147–153, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>>.

HU, G. L. et al. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food and Function**, v. 10, n. 6, p. 3113–3126, 2019.

HURLSTONE, David P.; CROSS, Simon S. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopic colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 20, n. 2, p. 173–181, 2005.

ILBÄCK, Nils Gunnar; SILLER, Max; STÅLHANDSKE, Torbjörn. Evaluation of cardiovascular effects of caffeine using telemetric monitoring in the conscious rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 834–842, 2007.

INCA INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de Intestino**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>>.

JESZKA-SKOWRON, Magdalena; STANISZ, Ewa; DE PEÑA, Maria Paz. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 243–250, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.018>>.

KLAMPFER, L. Cytokines, Inflammation and Colon Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 451–464, 2011.

LEMOS, Mayara Fumiere et al. Chemical and sensory profile of new genotypes of Brazilian Coffea canephora. **Food Chemistry**, v. 310, n. October 2019, 2020.

LI, Guowei et al. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of observational studies. **Public Health Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 346–357, 2013.

LITTLE, C. H. et al. The role of dietary polyphenols in the moderation of the inflammatory response in early stage colorectal cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2310–2320, 2017.

LUDWIG, Iziar A. et al. Coffee: Biochemistry and potential impact on health. **Food and Function**, v. 5, n. 8, p. 1695–1717, 2014.

MATSUNAGA, Kengo et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 3, n. 2, p. 163–166, 2012.

MIKOŁAJCZAK, Natalia; TAŃSKA, Małgorzata; OGRODOWSKA, Dorota. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, n. February, p. 110–138, 2021.

MIRANDA, Diego O. et al. Elevated serum levels of proinflammatory cytokines potentially correlate with depression and anxiety in colorectal cancer patients in different stages of the antitumor therapy. **Cytokine**, v. 104, n. December 2016, p. 72–77, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.030>>.

MOJICA, Benigno E. et al. The Impact of the Roast Levels of Coffee Extracts on their Potential Anticancer Activities. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 1125–1130, 2018.

MONTENEGRO, Júlia et al. Bioactive compounds, antioxidant activity and antiproliferative effects in prostate cancer cells of green and roasted coffee extracts obtained by microwave-assisted extraction (MAE). **Food Research International**, v. 140, n. December 2020, 2021.

MUÑOZ, Adelaida Esteban et al. Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. **Lwt**, v. 128, p. 109457, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109457>>.

MURATA, Mariko. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2018.

NIEDERREITER, Lukas; ADOLPH, Timon E.; TILG, Herbert. Food, microbiome and colorectal cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 7, p. 647–652, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.030>>.

PARK, Hea Jin et al. Chlorogenic acid differentially alters hepatic and small intestinal thiol redox status without protecting against azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 3, p. 362–370, 2010.

PASTOR, Ferenc T. et al. Development of voltammetric methods for antioxidant activity determination based on Fe(III) reduction. **Microchemical Journal**, v. 155, n. lii, 2020.

PERŠE, Martina; CERAR, Anton. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

RE, Roberta et al. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

REIS, Sandra Aparecida Dos; DA CONCEIÇÃO, Lisiane Lopes; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia. Intestinal microbiota and colorectal cancer: changes in the intestinal microenvironment and their relation to the disease. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1391–1407, 2019.

RESENDEZ, Angel et al. Rapid small intestinal permeability assay based on riboflavin and lactulose detected by bis-boronic acid appended benzyl viologens. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 115–121, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.031>>.

REZENDE, Yara Rafaella Ribeiro Santos; NOGUEIRA, Juliete Pedreira; NARAIN, Narendra. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (Malpighia

emarginata DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v. 254, p. 281–291, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.026>>.

RIBEIRO, Carla Caroline Dias et al. Effects of grape juice in superoxide dismutase and catalase in colorectal cancer carcinogenesis induced by azoxymethane. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 10, p. 2839–2844, 2018.

RODRIGUES, M. A.M. et al. Aberrant crypt foci and colon cancer: Comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, p. 351–355, 2002.

SAKAI, Yusuke et al. Peyer's patch-immunomodulating glucans from sugar cane enhance protective immunity through stimulation of the hemopoietic system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 505–514, 2019.

SANDOVAL-RAMÍREZ, Berner Andrée et al. Exploring the effects of phenolic compounds to reduce intestinal damage and improve the intestinal barrier integrity: A systematic review of in vivo animal studies. **Clinical Nutrition**, n. xxxx, 2020.

SANLIER, Nevin; ATIK, Azize; ATIK, Ilker. Consumption of green coffee and the risk of chronic diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2573–2585, 2019.

SARRIÁ, Beatriz et al. Long-term consumption of a green/roasted coffee blend positively affects glucose metabolism and insulin resistance in humans. **Food Research International**, v. 89, p. 1023–1028, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.032>>.

SCHERER, Rodrigo et al. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 408–413, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.007>>.

SCHERER, Rodrigo; GODOY, Helena Teixeira. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, 2009.

SI, Huifang et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora. **Seminars in Cancer Biology**, v. 70, p. 3–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.05.004>>.

SINGLETON, L. Vernon; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTOS, Rosa. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–177, 1999.

SONG, Peixia et al. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6227–6232, 2011.

TAVANI, Alessandra; VECCHIA, Carlo La. Coffee, decaffeinated coffee, tea and cancer of the colon and rectum: A review of epidemiological studies, 1990-2003. **Cancer Causes and Control**, v. 15, n. 8, p. 743–757, 2004.

TIAN, Changwei et al. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: A dose-response analysis of observational studies. **Cancer Causes and Control**, v. 24, n. 6, p. 1265–1268, 2013.

WHO, World Health Organization. **Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, all ages**. Disponível em: <[https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10)>.

WONGSA, Prinya et al. Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, n. May 2018, p. 579–587, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.088>>.

WU, Rong et al. Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2017.

## **5. CONCLUSÃO GERAL**

O café é a principal atividade agrícola do estado do Espírito Santo, sendo de grande importância econômica, caracterizando o estado como maior produtor da variedade conilon do Brasil. Ainda, o café conilon apresenta maiores teores dos compostos associados com os efeitos benéficos do café, como o ácido clorogênico, cafeína e trigonelina. O café verde, que é a forma natural, não torrada ou processada, apresenta valores maiores desses compostos bioativos, sendo uma melhor alternativa do que o torrado para ser utilizado como intervenção dietética para a redução dos riscos de desenvolvimento do câncer colorretal.

A busca por compostos bioativos naturais para associar a redução do risco de doenças como o câncer colorretal vem aumentando com o melhor entendimento da associação entre dieta e saúde. O presente estudo aponta o café verde como potencial terapêutico por contribuir para a integridade da barreira intestinal, reduzir alterações na mucosa causadas pela carcinogênese e reduzir o percentual de lesões pré-neoplásicas.

O estudo ainda abre possibilidade para estudos com humanos, podendo variar o tempo experimental e a dosagem do extrato de café verde.

## ANEXO

### Anexo A – Aprovação comitê de ética.



Universidade Federal  
do Espírito Santo



# CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito do extrato de café verde (*Coffea canephora*), do yacon (*Smallanthus sonchifolius*), do kefir e da associação entre yacon e kefir nas alterações locais e sistêmicas resultantes da carcinogênese colorretal em ratos"**

Registrada sob o n.º **032/2019**, sob a responsabilidade de **Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CAMPUS DE ALEGRE (CEUA-ALEGRE) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

**Vigência da autorização: 01/02/2020 a 01/03/2021**

**Finalidade: Pesquisa**

**Espécie(s): *Rattus norvegicus***

**Linhagem(ns)/raça(s): Wistar**

**Peso: 150 g**

**Idade: 45 dias**

**Sexo: Macho**

**Número de animais: 84**

**Origem: Biotério Central da UFES, Centro de Ciências da Saúde, campus Maruípe, Vitória - ES**

Alegre-ES, 11/12/2019

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivellin

Coordenador da CEUA-ALEGRE