

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

LUANA DALBEM MURAD

**EFEITOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO SOBRE O
CRESCIMENTO E CAPTAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO**

Rio de Janeiro

2013

Luana Dalbem Murad

**EFEITOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO SOBRE O
CRESCIMENTO E CAPTAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição - da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Rio de Janeiro

2013

M972 Murad, Luana Dalbem.
Efeitos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre o crescimento e
captação celular em células de adenocarcinoma de cólon humano /
Luana Dalbem Murad, 2013.
130 f. ; 30 cm

Orientador: Anderson Junger Teodoro.

Coorientadora: Mariana Costa Monteiro.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Antioxidantes. 3. Ácido cafeico.
4. Ácido 5-cafeoilquímico. I. Teodoro, Anderson Junger. II. Monteiro,
Mariana Costa. III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro.
Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em
Alimentos e Nutrição. IV. Título.

CDD – 616.994347

Luana Dalbem Murad

**EFEITOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO SOBRE O
CRESCIMENTO E CAPTAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO**

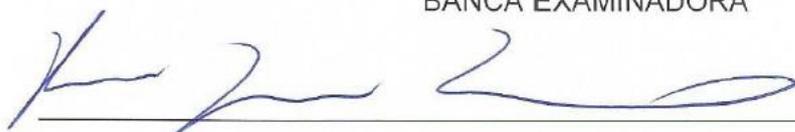
Dissertação de Mestrado – Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição - da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Co-orientador: Prof. Dr^a. Mariana Costa Monteiro

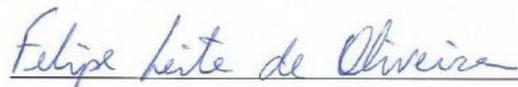
Aprovado em 20 / 09 / 13

BANCA EXAMINADORA



Dr. Anderson Junger Teodoro

Instituto de Nutrição / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Dr. Felipe Leite de Oliveira

Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dra. Eliane Fialho

Instituto de Nutrição / Universidade Federal do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais, Emídio e Carmelita,
pelo amor incondicional, por me ensinarem
o valor do trabalho, da honestidade e
a importância da perseverança...*

*Ao Leonardo, meu marido,
pela presença constante em minha vida...
pelo amor, carinho, compreensão e
companheirismo...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a oportunidade de aprendizado e evolução e, acima de tudo, perseverança.

Aos meus pais, Emídio e Carmelita, pelo amor e cuidado, pela educação e princípios que me legaram, por nunca terem medido esforços ao longo de toda minha jornada.

A meu marido Leonardo Murad por me compreender, me dar o estímulo, força e apoio incondicional. Por ter sido capaz de compreender minha ausência em muitos momentos, sendo sempre meu companheiro e, meu melhor amigo.

Ao Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro, meu orientador neste trabalho, meus sinceros agradecimentos por ter me aceito como orientanda. Obrigada pela oportunidade.

A Prof. Dra. Mariana Costa Monteiro por sua co-orientação e por me mostrar que vontade de ensinar e generosidade independem de colocação profissional.

A Prof. Dra. Lucia Polônio, pelo carinho, apoio e, incentivo.

Aos meus amigos e familiares que sempre me incentivaram e, acreditaram no meu potencial.

A amiga Nathalia da Costa Pereira Soares por seus ensinamentos, pelo apoio, paciência e auxílio em diversos experimentos.

Aos Laboratórios de Proliferação e Diferenciação Celular e de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, que possibilitaram a parte experimental deste trabalho.

Aos Professores Felipe Leite Oliveira e Camila Brand, pela colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. João Viola, por sua simplicidade e generosidade, estendendo-me a mão e, dando-me o auxílio que tanto precisava para dar continuidade ao meu projeto.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

O câncer de cólon é o terceiro mais prevalente, com uma taxa de incidência de um milhão de novos casos e, aproximadamente, meio milhão de mortes por ano, sendo uma doença multifatorial, com complexas interações. Atualmente, grande atenção tem sido dada a estratégias preventivas e, neste contexto, a utilização de alimentos funcionais com compostos quimiopreventivos parece contribuir muito neste processo, atuando através de diferentes mecanismos de ação. Entre essas substâncias, destacam-se o consumo dos ácidos hidroxicinâmicos, sendo sua ingestão associada à diminuição do risco de doenças crônicas, incluindo o câncer. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes e a captação intestinal dos ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA), bem como a influência destes compostos na viabilidade celular, progressão do ciclo celular e apoptose da linhagem de adenocarcinoma de cólon humano HT-29. As células da linhagem HT-29 foram cultivadas com DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C e, incubadas com diferentes concentrações de CA e 5-CQA (1,25 a 80 µM) por períodos de 0.5 h a 96 h, dependendo do experimento. A atividade antioxidante foi mensurada através dos métodos DPPH, FRAP e ORAC e a captação intestinal dos compostos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. As análises de viabilidade celular, ciclo celular e apoptose foram realizadas, respectivamente, através do método MTT e, por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico são potentes agentes antioxidantes, os quais são capazes de serem captados e metabolizados pelas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), gerando compostos intermediários e outros metabólitos secundários. Além disto, os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico foram capazes de reduzir a viabilidade celular da linhagem HT-29, com modificações no ciclo celular, levando ao aumento percentual de células na fase G₀/G₁, acompanhada de redução de células na fase G₂/M, além de promover um aumento na taxa de apoptose. Os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico mostraram-se potentes inibidores do crescimento celular, sugerindo, portanto, uma modulação do ciclo celular nas células de câncer de cólon, com um aumento da apoptose. Estes dados abrem uma série de perspectivas sobre a utilização destes compostos na prevenção e tratamento do câncer de cólon.

Palavras-chave: Ácido 5-cafeoilquínico. Ácido cafeico. Câncer de cólon.

ABSTRACT

Colon cancer is the third most prevalent, with the appearance of one million new cases per year and approximately half a million annual deaths. This is a multifactorial disease with complex interactions. Currently, great attention has been given to preventive strategies, and in this context, use of functional foods with chemopreventive compounds appears to contribute much in this process, working with different mechanisms of action. Among the substances, we highlight the consumption of hydroxycinnamic acids is associated with reduced risk of chronic diseases, including cancer. This study aimed to evaluate the antioxidant properties of caffeic (CA) and 5-caffeoylquinic (5-CQA) acids, the intestinal uptake and the influence of these compounds in cell viability, cell cycle progression and apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma. The cell line HT-29 was incubated with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum under an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cells were incubated with different concentrations of caffeic and 5-caffeoylquinic acids (1.25 to 80 µM) from 0.5 to 96hs, depending on the assay. Antioxidant activity was measured by DPPH, FRAP and ORAC and cellular uptake were analyzed by HPLC and HPLC-MS. Cell viability, cell cycle and apoptosis was measured, respectively, using MTT method and flow cytometry. Results demonstrated that CA and 5-CQA are potent antioxidants agents, which are capable of being absorbed and metabolized by human colon adenocarcinoma cells (HT-29), resulting in intermediates compounds and other secondary metabolites. Caffeic and 5-caffeoylquinic acids also were able to reduce the cell viability of the HT-29 cell line, promoting changes in the cell cycle leading to increased percentage of cells in G₀/G₁ phase, followed by a reduction of cells in G₂/M phase, besides promoting increased rate of apoptosis. Thus, caffeic and 5-caffeoylquinic acids showed as potent inhibitors of cell growth, suggesting a modulation of the cell cycle of colon cancer cell lines, with an increase in apoptosis. These data opens up a number of perspectives on the use of these compounds in the prevention and treatment of colon cancer.

Keywords: 5-caffeoylquinic acid. Caffeic acid. Colon cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação anatômica do intestino grosso	21
Figura 2	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma	24
Figura 3	Sequência adenoma-câncer	25
Figura 4	Progressão da doença (estágios 0-4)	31
Figura 5	Imagem microscópica das células HT-29 em baixa e alta resolução	36
Figura 6	Estrutura química do ácido quínico (a), dos ácidos hidroxicinâmicos (b) e exemplo de um isômero de um monoéster do ácido clorogênico (c)	38
Figura 7	Possível rota de absorção dos ácidos clorogênicos e ácidos hidroxicinâmicos livres	43
Figura 8	Esquema proposto para o metabolismo dos ácidos clorogênicos	44
Figura 9	Principais papéis dos ácidos clorogênicos na prevenção de doenças	45
Figura 10	Mecanismo potencial da atividade anti-câncer dos ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico	46
Figura 11	Percentual de redução do DPPH pela ação do 5-CQA (A) e CA (B) durante 30 minutos de ensaio	62
Figura 12	Percentual de redução dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico pelo método DPPH em diferentes concentrações, após 30 minutos de ensaio	63
Figura 13	Capacidade de redução do ferro dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em diferentes concentrações	65
Figura 14	Atividade antioxidante, avaliada pelo método ORAC, dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em diferentes concentrações	65
Figura 15	Concentração ($\mu\text{g/g}$ proteína) dos ácidos 5-	69

	cafeoilquínico (5-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 3-cafeoilquínico (3-CQA), cafeico (CA) e isoferúlico (IsoFA) no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 5 μ M de 5-CQA (0,5 h a 96 h)	
Figura 16	Concentração (μ g/g proteína) de 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA) no meio de cultura após a incubação com 5 μ M de 5-CQA (0,5 h a 96 h)	70
Figura 17	Concentração (μ g/g proteína) dos ácidos cafeico (CA), dihidrocafeico (DHCA) e 2,4-dihidroxibenzóico no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 5 μ M de CA (0,5 h a 96 h)	71
Figura 18	Cromatograma seletivo de íons do lisado celular obtido após análise por CLAE-EM	72
Figura 19	Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a viabilidade de células HT-29 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D) após a incubação	74
Figura 20	Efeito do ácido cafeico sobre a viabilidade de células HT-29 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D) após a incubação	76
Figura 21	Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 48 horas após a incubação	78
Figura 22	Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 96 horas após a incubação	79
Figura 23	Efeito do ácido cafeico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 48 horas após a incubação	80
Figura 24	Efeito do ácido cafeico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 96 horas após a incubação	81
Figura 25	Efeito dos ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA) sobre o processo de morte programada em células HT-29 48 h e 96 h após a incubação	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Percentual de incidência dos diversos tipos de cânceres no mundo	23
Tabela 2	Etapas da carcinogênese e proteínas relacionadas a cada etapa	26
Tabela 3	Principais fatores de risco para câncer colorretal	28
Tabela 4	Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal	32
Tabela 5	Teores de ácidos clorogênicos em diferentes alimentos	39
Tabela 6	Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com o ácido cafeico e 5-cafeoilquínico	56
Tabela 7	Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com o ácido cafeico e 5-cafeoilquínico via CLAE-EM	57
Tabela 8	Massas moleculares dos compostos monitorados por CLAE-EM	58
Tabela 9	Valor do IC50 (μM) dos ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA)	64
Tabela 10	Coeficientes de correlação (r) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante para os ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA)	66
Tabela 11	Efeito dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico ($5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de	83

Tabela 12

cólon humano (HT-29) 48 h após a incubação
Efeito dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico (5 μM
e 10 μM) sobre o processo de morte celular por
apoptose nas células de adenocarcionoma de
cólon humano (HT-29) 96 h após a incubação

84

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AAPH	Iniciador radical azo (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloro).
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área abaixo da curva
Bax	Bcl-2 associada a proteína X (do inglês, <i>Bcl-2 associated X protein</i>)
Bak	Proteína pró-apoptótica
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2 (do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BSS-CMF	Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
CA	Ácido cafeico
CAPE	Fenil éster do ácido cafeico
CD4	Glicoproteína de superfície das células imune
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CFQA	Ácido cafeoilferuloilquínico
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massas
CGA	Ácido clorogênico
C-myc	Oncogene c-myc
CoQA	Ácido p-cumaroilquínico
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPIR	Taxa de inibição da proliferação celular
diCQA	Ácido dicafeoilquínico
DHCA	Ácido dihidrocafeico
DMEM	Meio base de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Ácido ferúlico

FCA	Focos de criptas aberrantes
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
Fos	Oncogene Fos
FRAP	Capacidade ferri-redutora
FQA	Ácido feruloilquínico
GA	Ácido gálico
G0	Estado de quiescência das células durante o ciclo celular
G1	Primeira fase do ciclo celular
G2	Segunda fase do ciclo celular
GLIP1	Peptídeo gastrointestinal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HT-29	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
IC50	Concentração necessária para inibir 50% da atividade de um composto
IsoFa	Ácido isoferúlico
JNK	Proteína JNK (do inglês, <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
K-ras	Proteína k-ras
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Mitose
MCT	Transportador de ácido monocarboxílico
Myb	Gene Myb
MMP-2	Metaloproteinase-2
MMP-9	Metaloproteinase-9
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NCI	Nacional Cancer Institute
NF-KB	Fator de necrose tumoral KB
N-ras	Gene N-ras
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PBS	Solução salina tamponada (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
<i>p</i> -CoA	Ácido <i>p</i> -cumárico

pH	Potencial de hidrogênio
PSOF	Pesquisa de sangue oculto nas fezes
p27	Proteína 27 (proteína membro da família do inibidores das quinases-ciclina-dependentes)
p15	Proteína supressora de tumor 15
p16	Proteína 16
p21	Proteína 21
p53	Proteína citoplasmática supressora de tumor
S	Fase de replicação do DNA durante o ciclo celular
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SF	Sigmoidoscopia flexível
SFB	Soro fetal bovino
Sis	Gene Sis
THPPE	Ácido 3,4,5-trihidroxicinâmico
TGF-B	Proteína TGF-B (do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
TPTZ	Reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
VA	Ácido vanílico
VEGF	Fator de crescimento vascular associado ao endotélio
ORAC	
5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
3-CQA	Ácido 3-cafeoilquínico
4-CQA	Ácido 4-cafeoilquínico
3-FQA	Ácido 3-feruloilquínico
4-FQA	Ácido 4-feruloilquínico
5-FQA	Ácido 5-feruloilquínico
8-OH-dG	8-hidroxideoxiguanosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 INTESTINO GROSSO: O CÓLON	21
2.2 CÂNCER DE CÓLON	22
2.2.1 Sinais, sintomas e fatores de risco para o câncer de cólon	26
2.2.2 Screening e diagnóstico	28
2.2.3 Estadiamento da doença	30
2.2.4 Terapêutica	33
2.2.5 Câncer de cólon e fatores dietéticos	34
2.3 LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29	35
2.4 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	37
2.4.1 Absorção, biodisponibilidade e distribuição dos ácidos clorogênicos no organismo	39
2.4.2 Propriedades bioativas dos ácidos clorogênicos	44
2.4.3 Ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico: potentes compostos bioativos	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 REAGENTES	50
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CA E 5-CQA ISOLADOS	50
4.2.1 Método DPPH	50
4.2.2 Método FRAP	52
4.2.3 Método ORAC	53
4.3 CULTURA DE CÉLULAS	53
4.4 INCUBAÇÃO DOS COMPOSTOS EM LINHAGEM CÉLULAS HT-29	54
4.5 DOSAGEM DO CA, 5-CQA E METABÓLITOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON	55

(HT-29)	
4.5.1 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
4.5.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE/EM)	57
4.5.3 Determinação de proteína do precipitado celular e meio de cultura	58
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	59
4.7 ENSAIO DE CICLO CELULAR	59
4.8 ENSAIO DE APOPTOSE	60
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
5 RESULTADOS	61
5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CA E 5-CQA ISOLADOS	61
5.2 CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DO CA E 5-CQA PELAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)	67
5.2.1 Incubação com o ácido 5-cafeoilquínico	67
5.2.2 Incubação com o ácido cafeico	70
5.3 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	73
5.4 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	77
5.5 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)	82
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÃO	99
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO A - CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR (µg/g DE PROTEÍNA) DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO NAS CÉLULAS HT-29 APÓS O TRATAMENTO COM MEIO DE CULTURA PADRÃO SUPLEMENTADO COM 5 µM DE CA E 5-CQA DURANTE 96 h	115

ANEXO B - CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR ($\mu\text{g/g}$ DE PROTEÍNA) DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO NAS CÉLULAS HT-29 APÓS O TRATAMENTO COM MEIO DE CULTURA PADRÃO SUPLEMENTADO COM 5 μM DE CA E 5-CQA DURANTE 96 h	116
ANEXO C - ARTIGO INTITULADO “ANTICANCER PROPERTIES OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS – A REVIEW”, PUBLICADO NA REVISTA CANCER AND CLINICAL ONCOLOGY, EM NOVEMBRO DE 2012.	117

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cólon configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, com um percentual de incidência mundial de cerca de 9,7% (INCA, 2011). A cada ano, no mundo, são diagnosticados cerca de um milhão de novos casos e, neste mesmo período, ocorre meio milhão de mortes conseqüentes do câncer colorretal (SANTOS JUNIOR, 2007).

O câncer de cólon é, em geral, uma neoplasia maligna e, está relacionado a fatores ambientais, especialmente dietéticos, à predisposição genética e à obesidade, entre outros fatores (DINI & KOFF, 2006).

Diversas estratégias preventivas vêm sendo utilizadas no combate aos mais variados tipos de câncer e, neste contexto, a utilização de alimentos que contenham compostos quimiopreventivos, também chamados de bioativos, parecem contribuir positivamente, atuando através de diferentes mecanismos de ação que incluem: anti-carcinogênicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e antiangiogênicos (UPADHYAYA et al., 2007). Entre estes compostos, os ácidos clorogênicos têm sido estudado devido ao seu potencial na prevenção de diversos tipos de câncer (CAVIN, 2002; ULLMAN & ITZKOWITZ, 2011).

Ácido clorogênico (CGA) é o nome utilizado para identificar um grupo de compostos fenólicos formados a partir da esterificação entre os ácidos *trans*-cinâmicos (*p*-cumárico, ferúlico e cafeico) e o ácido quínico (CLIFFORD, 1999; 2000). Dentre os compostos da família dos CGA, o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) é um dos compostos mais abundantes e mais encontrados em alimentos naturais (MANACH et al., 2004; HIGDON & FREI, 2006).

Os CGA são abundantes em grãos de café, frutas vermelhas, maçãs, cidra e, em alguns outros vegetais, como batata-doce e cenoura, além de estarem presentes em vinhos e diferentes ervas, tal como, erva-mate (CLIFFORD, 1999).

Estudos recentes indicam que somente uma pequena porcentagem dos CGA ingeridos é absorvida no estômago, sendo a maior parte destes metabolizados e absorvidos a nível intestinal. Os CGA não absorvidos no intestino delgado seguem em direção ao intestino grosso, onde, então, estes podem sofrer ação de bactérias intestinais (DUARTE & FARAH 2011; MARQUES & FARAH, 2010; MONTEIRO, MARQUES & FARAH, 2010a).

Diversos trabalhos demonstram que os CGA exercem papel preventivo no desenvolvimento do câncer de cólon humano e inibem a proliferação de células tumorais de diferentes linhagens (MCCANN et al., 2007; JANICKE et al., 2011; KURATA et al., 2007; JAGANATHAN et al., 2009). Evidências sugerem que a inibição do crescimento celular, a desregulação do ciclo celular e a indução da apoptose sejam dependentes da interferência sobre o potencial redox destas células, devido ao potencial antioxidante destes compostos (GRANADO-SERRANO et al., 2007).

Adicionalmente, ensaios *in vivo* e *in vitro* também têm sido realizados no intuito de confirmar as propriedades dos CGA. Algumas destas propriedades, verificadas nos ensaios *in vitro* incluem: atividade antioxidante (MOREIRA et al., 2005), imuno-estimulante (TATEFUJI et al., 1996); efeito indutor no aumento da imunidade (FARAH, 2004), característica anti-mutagênica (WOOD *et al.*, 1982) e neuroprotetora (KIM et al., 2005).

Apesar de não ser considerado um nutriente essencial, estudos têm demonstrado que os CGA podem trazer muitos benefícios para à saúde humana (BOSSCHER, et al., 2009). Visto que os CGA são extensamente metabolizados no organismo humano, é de extrema importância que os efeitos *in vitro* e *in vivo* destes compostos sejam avaliados.

A partir do exposto acima, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da captação intestinal dos ácidos clorogênicos e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTESTINO GROSSO: O CÓLON

O intestino grosso é composto pelo cólon e reto, sendo que a maior parte deste é composta pelo cólon, um tubo muscular de aproximadamente 1,5m de comprimento, dividido em quatro segmentos de acordo com suprimento vascular para cada parte: cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente e sigmóide (YEATMAN, T.J., 2001).

A porção inicial do intestino grosso é denominada ceco e é onde se encontra o apêndice vermiforme. Junto à parede abdominal direita, em direção ascendente ao fígado, encontra-se o segmento chamado de cólon ascendente. Após este, o intestino grosso atravessa o abdome até a parede abdominal esquerda, junto ao baço, passando, então, a ser denominado de cólon transverso. O cólon transverso, por sua vez, segue até a parte inferior esquerda, passando a ser denominado de cólon descendente (BRASIL, 2003) (Figura 1).

As junções entre o cólon ascendente e transverso e entre este e o descendente são chamadas de flexuras hepática e esplênica, respectivamente. Após o cólon descendente, o intestino grosso torna-se solto e em forma de “S”, recebendo o nome de sigmóide (ALTERI, R. et al., 2011).

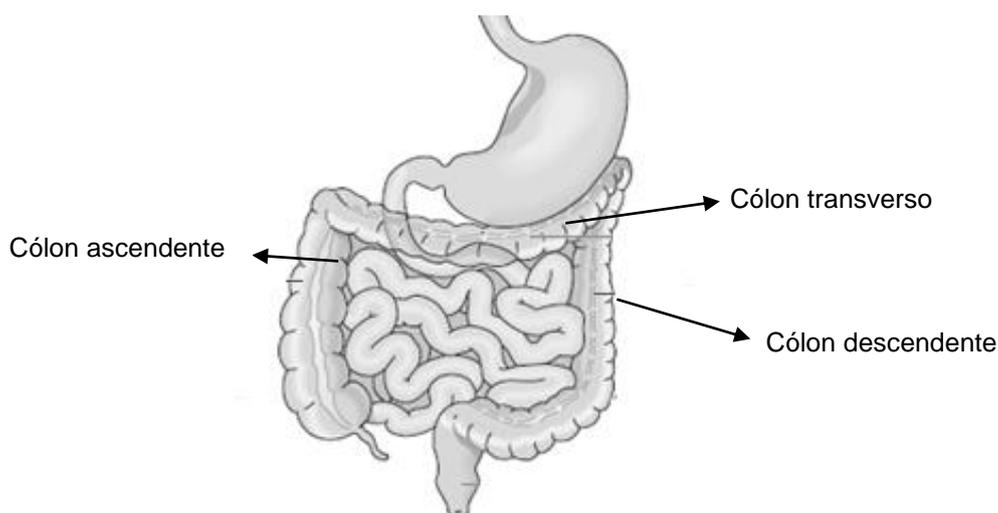


Figura 1. Representação anatômica do intestino grosso. Extraído de Yeatman, 2001.

As paredes do cólon e reto são compostas de várias camadas, incluindo mucosa, submucosa, muscular própria e serosa. A camada mais íntima da parede do intestino, a mucosa, é composta por uma camada única de células epiteliais colunares, a qual produz grande quantidade de muco, sendo, assim, denominadas de células caliciformes. Este é o sítio das primeiras alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer (YEATMAN, T.J., 2001).

2.2 CÂNCER DE CÓLON

O câncer é uma doença resultante de alterações genéticas que são capazes de alterar a constituição química do DNA. Geralmente, os genes atingidos estão relacionados aos processos de indução e controle do ciclo de divisão celular e/ou a um desequilíbrio no controle da morte celular programada (FERREIRA & ROCHA, 2004).

No crescimento celular, há um aumento da massa celular, duplicação do DNA, divisão da célula em duas idênticas e descrição do ciclo mitótico, através das seguintes fases: G1, S, G2, M e G0 (BRASIL, 2003). O controle deste crescimento celular parece estar na dependência de fatores estimulantes e inibidores. Normalmente, o crescimento celular encontra-se em equilíbrio, até que haja o surgimento de um estímulo de crescimento efetivo, sem ativação do mecanismo inibidor (ALBERTS et al., 2004).

Em algumas ocasiões, pode ocorrer a ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular e, uma célula começar a crescer e dividir-se desordenadamente. Pode daí resultar um clone de células descendentes, herdeiras dessa propensão ao crescimento e divisão anômalos, insensíveis aos mecanismos reguladores normais, que resulta na formação do que se chama tumor ou neoplasia, que pode ser benigna ou maligna (INCA, 1999).

Os tumores ou neoplasias malignas originadas dos epitélios de revestimento externo e interno são denominados carcinomas. Quando o epitélio de origem for glandular, passam, contudo, a ser chamadas de adenocarcinomas (INCA, 1999).

Acredita-se que muitos agentes ambientais tais como vírus, agentes químicos e fatores dietéticos possam causar as anormalidades genéticas presentes nos tumores. Em relação aos fatores dietéticos, estima-se que cerca de 30-40% de todos

os casos de câncer são influenciados pelos hábitos alimentares (ARDEKANI & JABBARI, 2009).

Levantamentos recentes, que avaliaram a incidência de câncer mundial, estimaram que em todo mundo 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por câncer ocorreram em 2008. Conforme apresentado na Tabela 1, o câncer de pulmão prevalece entre os de maior incidência, seguido dos cânceres de mama, colorretal, estômago, próstata e fígado (FERLAY et al., 2010).

Tabela 1. Percentual de incidência dos diversos tipos de cânceres no mundo.

TIPO DE CÂNCER	PERCENTUAL DE INCIDÊNCIA
Pulmão	12,7%
Mama	10,9%
Colorretal	9,7%
Estômago	7,8%
Próstata	7,2%
Fígado	5,9%

Fonte: Adaptado de Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2011.

Ao avaliar o câncer colorretal, cerca de 608 mil mortes são estimadas em todo o mundo. Conforme demonstrado na Figura 2, para o Brasil, no ano de 2012, foram estimados 14.180 casos novos de câncer do cólon em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%		Homens Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (Adaptado de INCA, 2011).

O câncer do cólon configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres e estima-se que cerca de 60% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas (INCA, 2011).

Em particular, o câncer colorretal desenvolve-se através de vários estágios. O primeiro estágio é caracterizado pela hiperplasia, resultante de mutações nos genes responsáveis pela reparação do DNA e, em alguns casos, por uma hiperproliferação incontrolável de células nas criptas do cólon. Adicionalmente, mutações nos genes que controlam o ciclo celular podem ocorrer e levar a uma expansão de clones neoplásicos a partir das células das criptas intestinais. Rapidamente, a neoplasia intraepitelial espalha-se para vários locais da mucosa do cólon, dando origem aos pólipos adenomatosos, os quais permanecem, ainda nesta fase, pré-invasivos ou pré-malignos. Contudo, estas células podem se tornar invasivas ao cruzarem a membrana basal do epitélio e se expandir para outros tecidos (ROYNETTE et al., 2004).

Portanto, o desenvolvimento da neoplasia do cólon segue uma progressão clara, atribuída à transformação do epitélio normal da mucosa do cólon a pólipos adenomatosos e, por último, ao câncer invasivo (PALOZZA et al., 2009; SERVEI CATALÀ DE LA SALUT, 2000). A sequência adenoma-câncer representa a contrapartida morfológica da carcinogênese por múltiplos passos dirigidos por alterações genéticas. O adenoma ou pólipo adenomatoso tem papel fundamental no desenvolvimento do câncer, sendo reconhecido como sua única lesão precursora (BRASIL, 2003) (Figura 3).

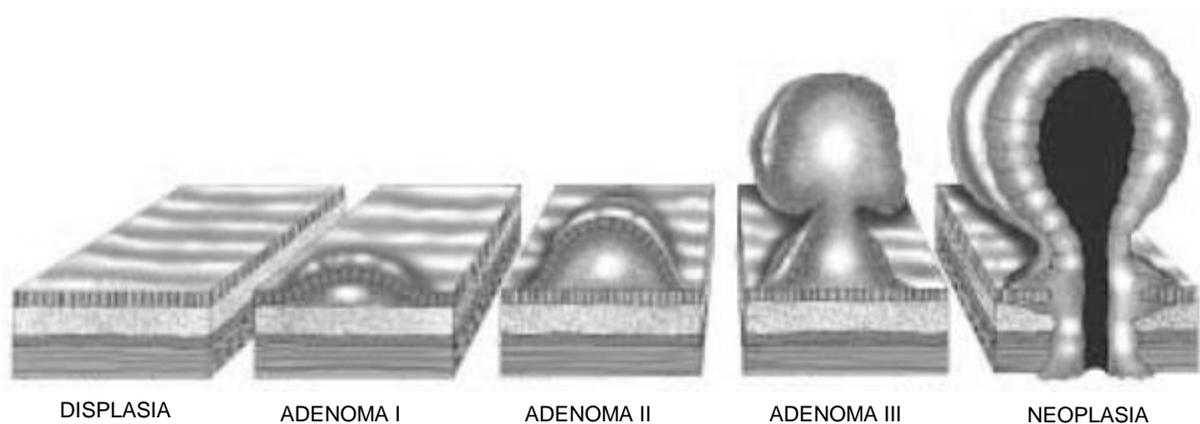


Figura 3. Sequência adenoma-câncer (BRASIL, 2003).

A mais forte evidência indireta de que os pólipos adenomatosos originam câncer provém do estudo do “National Polyp Study” (NPS), conduzido nos Estados Unidos. Nesse estudo, 1418 pacientes foram submetidos à colonoscopia e tiveram todos os pólipos encontrados removidos. Após seguimento de seis anos, observou-se uma redução de 76 a 90% na incidência de câncer do intestino em relação a três populações de referência (BRASIL, 2003).

Quanto ao potencial maligno de pólipos adenomatosos, foi demonstrado no NPS que o risco de câncer aumenta para um adenoma com o seu tamanho e quando sua histologia é do tipo vilosa. A transformação maligna de um pólipo maior que 1 cm ocorreu em período médio de 5,5 anos e de pólipos menores, em cerca de 10 anos, demonstrando a designada seqüência adenoma-câncer. Estes cânceres foram detectados por colonoscopia e não pela presença dos sintomas, o que demonstra, de acordo com este estudo, a longa evolução natural do câncer originado de um adenoma (BRASIL, 2003).

Discute-se, em certo número de casos, se o câncer do intestino pode se desenvolver sem passar pela seqüência adenoma-câncer, isto é, o chamado câncer “de novo”. Nas doenças inflamatórias crônicas intestinais é provável que focos pequenos e planos de displasia epitelial possam desencadear a via histogênica, à semelhança do que ocorre para o câncer gástrico e do esôfago (BRASIL, 2003).

Atualmente, a correlação entre os aspectos histológicos e a expressão de diferentes proteínas mostrou que cada processo da carcinogênese é intermediado por um grande número de moléculas protéicas que desempenham funções

específicas. A Tabela 2 ilustra as principais etapas da carcinogênese e as proteínas envolvidas.

Tabela 2. Etapas da carcinogênese e proteínas relacionadas a cada etapa.

ETAPAS DA CARCINOGENESE	PROTEÍNAS RELACIONADAS
Proliferação celular	Ciclinas A, B, D1 e E p15 p27 p53 Bcl-2
Angiogênese	VEGF COX-2 FGF
Invasão	Filamina Vilina Fibronectina Colágeno
Migração	Lectinas Integrinas Caderinas Metaloproteases

Fonte: Pinho, M.S.L. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: uma revolução silenciosa em andamento. Rev. Bras. Coloproct., 28 (3), 353-368, 2008.

2.2.1 Sinais, sintomas e fatores de risco para o câncer de cólon

O câncer colorretal, em estágio inicial, normalmente não apresenta sintomas, sendo, portanto, de fundamental importância a realização dos testes de rastreio (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Alguns sinais que podem aparecer são: sangramento retal, presença de sangue nas fezes, alteração do hábito intestinal, cólicas na parte inferior do abdômen, sensação de desconforto, ausência de peristaltismo e perda de peso anormal não programada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Os sinais e sintomas mais prevalentes, segundo estudo realizado por Carneiro et al. (2006) foram: dor abdominal, presente em 72,7% dos casos; alteração do hábito intestinal que se apresentava em 63,6% dos casos, além de perda ponderal, dor retal e hematoquezia, presentes em 54,5% dos casos.

Em geral, o câncer colorretal é diagnosticado em sua fase avançada, mesmo em indivíduos assintomáticos submetidos a rastreamento prévio por colonoscopia e, os sinais e sintomas podem variar de acordo com a localização do tumor (CRUZ et al., 2007).

Existem muitos fatores que aumentam ou diminuem o risco de câncer colorretal, sendo alguns modificáveis e outros não (Tabela 3). Os fatores de risco não modificáveis incluem histórico pessoal ou familiar de câncer colorretal ou pólipos adenomatosos, e uma história pessoal de doença inflamatória intestinal crônica. Já, os fatores de risco modificáveis, que normalmente têm sido associados com um risco aumentado de câncer colorretal em estudos epidemiológicos, incluem o sedentarismo, a obesidade, o consumo elevado de carnes vermelhas ou processadas, tabagismo e consumo moderado a elevado de álcool.

Pessoas com um parente de primeiro grau (pai, irmão ou filho), que já teve câncer colorretal têm 2 a 3 vezes mais risco de desenvolver a doença em comparação com indivíduos sem história familiar. Se o parente foi diagnosticado em uma idade jovem, ou se há mais de um parente afetado pela doença, o risco aumenta para 3 a 6 vezes do que a população em geral (BUTTERWORTH et al., 2006; JOHNS & HOULSTON, 2001).

Indivíduos portadores de doença inflamatória intestinal crônica, tais como, colite ulcerativa e doença de Crohn, têm um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal, risco este que aumenta com a extensão e duração da doença (BERNSTEIN et al., 2001).

Estudo recente concluiu, contudo, que cerca de um quarto dos casos de câncer colorretal pode ser evitado seguindo um estilo de vida saudável, ou seja, a manutenção de um peso adequado, ser fisicamente ativo, adotar uma dieta saudável, não fumar e não beber quantidades excessivas de álcool.

Tabela 3. Principais fatores de risco para câncer colorretal.

FATORES QUE AUMENTAM O RISCO	RISCO RELATIVO (*)
Hereditariedade e história médica	
História familiar	
▪ 1 parente de primeiro grau	2.2
▪ Mais do que 1 parente	4.0
▪ Parentes com diagnóstico antes dos 45 anos	3.9
Doença inflamatória intestinal (cólon)	
▪ Doença de Crohn	
▪ Colite ulcerativa	2.6
Cólon	
Reto	1.9
Diabetes	1.2
Outros fatores	
▪ Obesidade	1.2
▪ Consumo de carne vermelha	1.2
▪ Consumo de carne processada	1.2
▪ Fumar	1.2
▪ Consumo de álcool	1.1
Fatores que diminuem o risco	
▪ Atividade física	
Homens	0.8
Mulheres	0.7
▪ Cálcio	0.8
▪ Ingestão de leite	0.9

(*) Risco relativo compara o risco de desenvolvimento da doença entre um grupo de pessoas com uma determinada exposição em relação a um grupo de pessoas sem esta exposição. Fatores de risco dietéticos são normalmente avaliados comparando-se um alto consumo com baixo consumo. Se o risco relativo for maior do que 1.0, o risco é maior entre as pessoas expostas do que as não expostas. Se o risco relativo for menor do que 1.0 indica um efeito protetor.

Fonte: adaptado de Alteri et al., 2011.

2.2.2 Screening e diagnóstico

O aspecto mais desfavorável relacionado ao câncer de cólon está ligado ao seu diagnóstico e decorre do silencioso desenvolvimento da lesão e do longo período em que ela permanece assintomática (FABRE et al., 2000; JANAKIRAM & RAO, 2008).

O teste de rastreio se faz importante, portanto, por indicar a presença de pólipos ou câncer antes do surgimento dos primeiros sintomas. Quanto mais cedo, a doença for confirmada, mais efetivo será o tratamento e as chances de cura (CUTSEM & OLIVEIRA, 2008; ZAVORAL et al., 2009). O rastreio é o programa para a efetiva utilização de testes, relativamente, simples e baratos, em uma grande

população de indivíduos assintomáticos, a fim de identificar aqueles com risco elevado de desenvolver câncer ou uma lesão pré-maligna. Somente os indivíduos testes positivos, no teste de rastreamento, serão submetidos ao mais complexo diagnóstico (ALMEIDA et al., 2000; PATWARDHAN et al., 2006).

O rastreio na população geral tem-se concentrado no uso da pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF) e na sigmoidoscopia flexível (SF) (SHOKAR et al., 2010; CUTSEM & OLIVEIRA, 2008; MELO & BRAGA, 2003; U. S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2002; ZAVORAL et al., 2009).

A PSOF é confiável para a detecção de sangramento e não para diagnóstico de câncer gastrointestinal. Resultados falso-positivos podem ocorrer por perdas sanguíneas até o momento consideradas fisiológicas ou decorrente de lesões não neoplásicas. Resultados falso-negativos também podem ocorrer e estão relacionados ao caráter intermitente do sangramento das neoplasias. Por essa razão, é importante a associação do toque retal e da retossigmoidoscopia à pesquisa do sangue oculto, para aumentar a porcentagem de diagnósticos positivos no diagnóstico do câncer colorretal (BRASIL, 2003).

A sensibilidade dos testes mencionados varia entre 30% a 80% para o câncer de cólon e de 0% a 40% para os adenomas, podendo falhar a detecção de adenomas de risco e mesmo de câncer de cólon numa percentagem que pode ir até 70%. A especificidade para pólipos e câncer de cólon varia entre 95 a 98% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Por sua vez, a sigmoidoscopia flexível é um exame endoscópico com alcance máximo para a flexura esplênica. É capaz de detectar pólipos de histologia e potencial neoplásico variados, em cerca de 23 a 38% dos pacientes avaliados. Este exame, portanto, é uma opção alternativa ou complementar da pesquisa de sangue oculto nas fezes no rastreio do câncer de cólon (ALMEIDA et al., 2000).

O método de escolha para detecção e remoção de neoplasias de cólon é a colonoscopia, alargando os benefícios oferecidos pela sigmoidoscopia e pesquisa de sangue oculto nas fezes (ALMEIDA et al., 2000). Sua maior vantagem é a possibilidade de remoção das lesões patológicas dentro de um único exame (SERVEI CATALÀ DE LA SALUT, 2000). É mais sensível na detecção de ambos os adenomas e carcinomas, porém há poucos dados disponíveis na redução da

incidência e mortalidade por câncer de cólon, e no intervalo recomendado entre os exames (SCHMIEGEL et al., 2009).

O prognóstico dos pacientes com câncer de cólon está claramente relacionado com o grau de penetração do tumor através da parede do intestino, a presença ou ausência de comprometimento nodal e à presença ou ausência de metástases. Essas três características formam a base para todos os sistemas de testes desenvolvidos para esta doença (PATWARDHAN et al., 2006; SERVEI CATALÀ DE LA SALUT, 2000).

2.2.3 Estadiamento da doença

Na presença de um diagnóstico de câncer de cólon, faz-se necessário determinar a extensão da doença e, de acordo com publicação do NCI – USA (2008), exames adicionais aos que já foram previamente realizados devem ser solicitados. A mensuração do antígeno carcinoembrionário (CEA) tem grande importância prognóstica, uma vez que este estará elevado nos indivíduos portadores de câncer de cólon. Uma nova colonoscopia, caso haja a necessidade de um exame mais minucioso pode ser solicitada, bem como, exames que permitam diagnosticar a disseminação de células neoplásicas aos demais órgãos (NCI – USA, 2008).

Estadiamento é o sistema usado para classificar o câncer de acordo com regras estabelecidas e aceitas universalmente. O objetivo do estadiamento na enfermidade neoplásica é o de identificar não somente a extensão loco-regional da lesão primária, mas também a sua extensão à distância, para a escolha da melhor opção de tratamento (CORDEIRO et al., 2001).

Para o câncer colorretal, o estadiamento é determinado pela avaliação da extensão da sua penetração na espessura da parede intestinal, pela presença ou ausência de metástases nos linfonodos ou pela propagação do tumor para outros órgãos (metástases) (ALTERI et al., 2011).

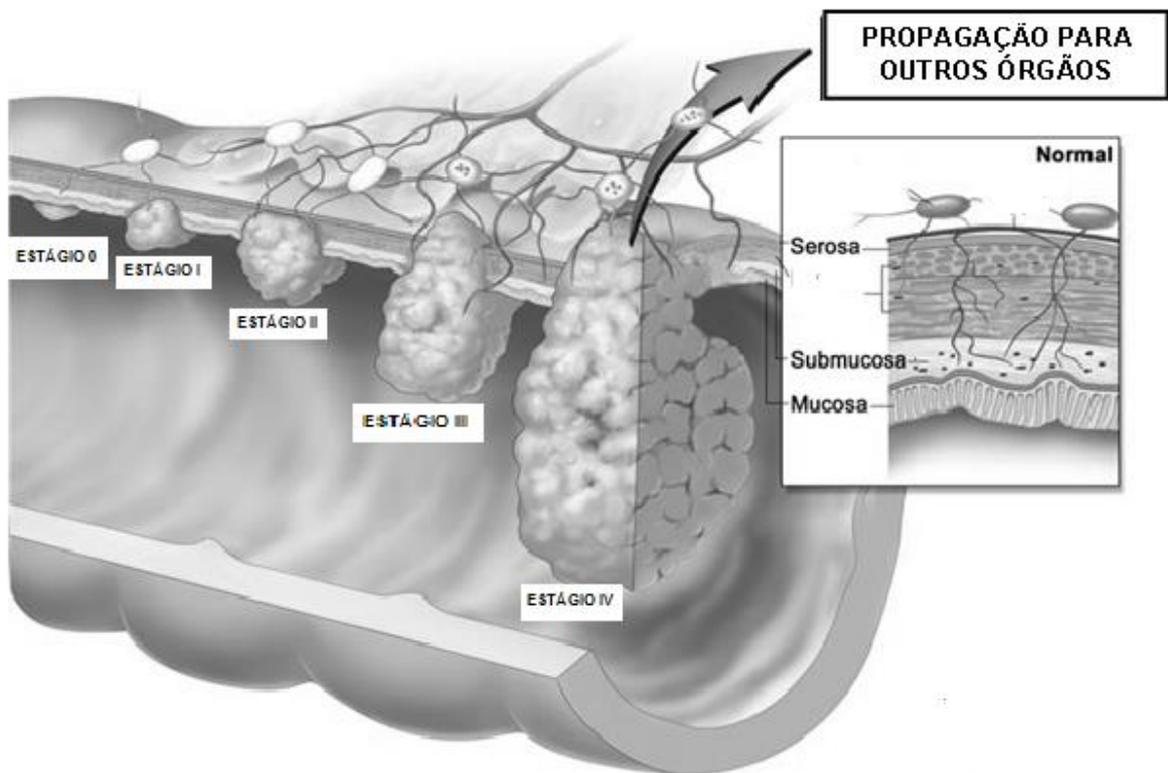


Figura 4. Progressão da doença (estágios 0-4) (NCI, 2006).

Conforme ilustrado na Figura 4, a doença é dividida em cinco estágios e/ou fases: i) fase 0= é o estágio mais inicial de classificação, também chamado de carcinoma *in situ*, pois o câncer se restringe ao revestimento interior do cólon; ii) fase 1= o câncer se estende às camadas médias do cólon, mas não atravessa as paredes do intestino; iii) fase 2= o tumor ultrapassa as paredes do intestino e dissemina-se para tecidos vizinhos, mas ainda não acomete os gânglios da região; iv) fase 3= o câncer invade os gânglios vizinhos, mas não outras partes do corpo; v) fase 4= é o estágio mais avançado da doença. Nesta fase, o tumor já é detectado à distância do local de origem, como no fígado e nos pulmões (NCI, 2006).

A Tabela 4 contém as definições utilizadas pelo sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para determinar o estadiamento do câncer colorretal (ALTERI et al., 2011). De acordo com a classificação TNM obtém-se a classificação dos estádios de 0 a IV.

Tabela 4. Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.

TNM		
Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à distância (M)
(TX) Tumor primário inacessível	(NX) Linfonodos regionais inacessíveis	(MX) Presença de metástases a distância não pode ser observada
(TO) Sem evidência do tumor primário	(NO) Sem evidências de linfonodos regionais	(MO) Sem metástases à distância
(Tis) Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial ou invasão da lâmina própria	(N1) Metástases em um até três linfonodos pericólicos ou perirretais	(M1) Metástases à distância
(T1) Tumor invadindo submucosa	(N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais	
(T2) Tumor invadindo a muscular própria	(N3) Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular principal e/ou metástase no linfonodo apical desta cadeia	
(T3) Tumor invadindo através da muscular própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais		
(T4) Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfurando vísceras peritoneais		

* T traduz a extensão do tumor primário, seu grau de penetração na parede intestinal;
 N traduz a presença ou ausência e extensão das metástases linfonodais;
 M traduz a presença ou ausência de metástases a outros órgãos.
 Fonte: BRASIL, 2003.

Tabela 4. Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.

AJCC/UICC ESTÁGIO	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODOS REGIONAIS	METÁSTASES À DISTÂNCIA	DUKES	ASTLER COLLER
Estádio 0	Tis	N0	M0		
Estádio I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
Estádio II	T3	N0	M0	B	B2
	T4	N0	M0	B	B3
Estádio III	Qualquer T	N1	M0	C	C1
	Qualquer T	N2	M0	C	C2
	Qualquer T	N3	M0	C	C3
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	C	D

* T traduz a extensão do tumor primário, seu grau de penetração na parede intestinal;

N traduz a presença ou ausência e extensão das metástases linfonodais;

M traduz a presença ou ausência de metástases a outros órgãos.

Fonte: BRASIL, 2003.

2.2.4 Terapêutica

A escolha do tratamento depende, principalmente, da localização do tumor no cólon e da extensão da doença. As possíveis formas de tratamento dividem-se em dois grupos: a terapia local e a terapia sistêmica (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2006).

Conforme dados obtidos pelo NCI – USA (2006-2007), a terapia local engloba a cirurgia e a radioterapia, pois ambos removem ou destroem o câncer localizado no cólon ou próximo a ele. Quando o tumor já está disseminado, a terapia local pode ser útil no controle da doença nestas regiões específicas. Por outro lado, a terapia sistêmica abrange a quimioterapia e a terapia biológica. Neste caso, a droga administrada alcança a corrente sanguínea a fim de destruir ou controlar o tumor, em toda a extensão do corpo.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) (1996-2010) e o Serviço de Saúde do Catalão (2000) relatam a cirurgia como o tratamento mais usual para o câncer de cólon.

Em pacientes com câncer de cólon estágio III, sem contraindicações médicas ou psicossociais para o tratamento, é recomendada a quimioterapia adjuvante após ressecção cirúrgica. A poliquimioterapia paliativa também aumenta a sobrevida para aqueles com doença em estágio IV, embora não seja curativa (PATWARDHAN, 2006; SARGENT et al., 2001).

A terapia biológica, às vezes, administrada em conjunto com a quimioterapia, é muito utilizada nos estágios mais avançados da doença. Neste, o paciente recebe um anticorpo monoclonal, o qual alcança as células cancerígenas interferindo em seu crescimento e na disseminação da doença (KLEIJN & PUNT, 2002). Já o papel da radioterapia adjuvante para pacientes com câncer de cólon não está bem definido (PATWARDHAN, 2006).

Em relação aos efeitos colaterais, estes dependem do tratamento e, sobretudo, dos fármacos e doses utilizadas. Os fármacos utilizados no tratamento do câncer de cólon podem danificar também as células sadias do corpo que apresentam alta capacidade proliferativa, reduzindo, portanto, a atividade imunológica do paciente, uma vez que atuam, principalmente, em células sanguíneas, hepáticas e intestinais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

2.2.5 Câncer de cólon e fatores dietéticos

Apesar das causas de câncer de cólon não serem totalmente compreendidas, fatores dietéticos parecem ser importantes. Os estudos destacam a importância das influências ambientais sobre o desenvolvimento do câncer colorretal e sugerem que o estilo de vida característico dos países industrializados, tais como hábitos alimentares, obesidade e inatividade física parecem desempenhar papel fundamental na etiologia da doença. Os hábitos alimentares têm sido considerados importantes influências no risco de câncer colorretal e estima-se que até 90% das mortes por câncer de colorretal nos EUA poderia ser prevenida por intervenção dietética (HARRIS & GO, 2004).

Dentre os fatores dietéticos associados ao desenvolvimento do câncer colorretal, sabe-se que a ingestão de alimentos ricos em fibras alimentares e em vitaminas do complexo B estaria associada à baixa incidência (SCHARLAU et al., 2009; HOWE et al., 1992). As hipóteses que justificam a associação inversa entre o alto consumo de fibras alimentares e a baixa incidência de câncer colorretal são: redução do tempo de trânsito intestinal, diluição do conteúdo no cólon e estimulação da fermentação pelas bactérias anaeróbias, com aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) (SCHARLAU et al., 2009).

Vale ressaltar que a ingestão de alimentos ricos em fibras alimentares também contribui para o aumento da ingestão de outros nutrientes e fitoquímicos, incluindo compostos fenólicos que possuem propriedades anticancerígenas (SURH, 2003). Dados epidemiológicos mostram que o consumo de frutas e vegetais ricos em compostos fenólicos, contribui para a redução do risco de câncer (SUGIMURA, 2002). Os compostos fenólicos atuam inibindo a geração de radicais livres, interrompendo a propagação de reações seqüenciais de radicais livres e inibindo a ativação metabólica de compostos carcinogênicos (BRASH et al., 2002).

Uma ampla classe de compostos bioativos tem sido investigada no intuito de comprovar a sua relação tanto com a prevenção como com o tratamento de certos tipos de câncer, sendo que aqueles que possuem atividade antioxidante têm apresentado indícios de seu eventual papel protetor sobre o câncer colorretal. Além dos antioxidantes tradicionais como os carotenóides e as vitaminas C e E, os compostos fenólicos têm sido descritos na literatura por possuir atividade antioxidante superior a esses tradicionais antioxidantes (RICE-EVANS & MILLER, 1997).

Dentre os inúmeros compostos fenólicos já relatados na literatura, os ácidos hidroxicinâmicos têm recebido atenção da comunidade científica em virtude da sua relação com a redução do risco relativo do desenvolvimento de alguns tipos de câncer, dentre eles o câncer de cólon (CAVIN, 2002).

2.3 LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29

A linhagem HT-29 foi derivada, em 1964, a partir do tumor de uma mulher de 44 anos de idade com adenocarcinoma de cólon. As células HT-29 são células epiteliais intestinais humanas, com característica aderente e tumorigênica. Suas estruturas morfológicas incluem microvilosidades, microfilamentos, mitocôndrias com grânulos escuros e lisos, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres, gotículas lipídicas e muitos lisossomos secundários (FOGH et al., 1977) (Figura 5).

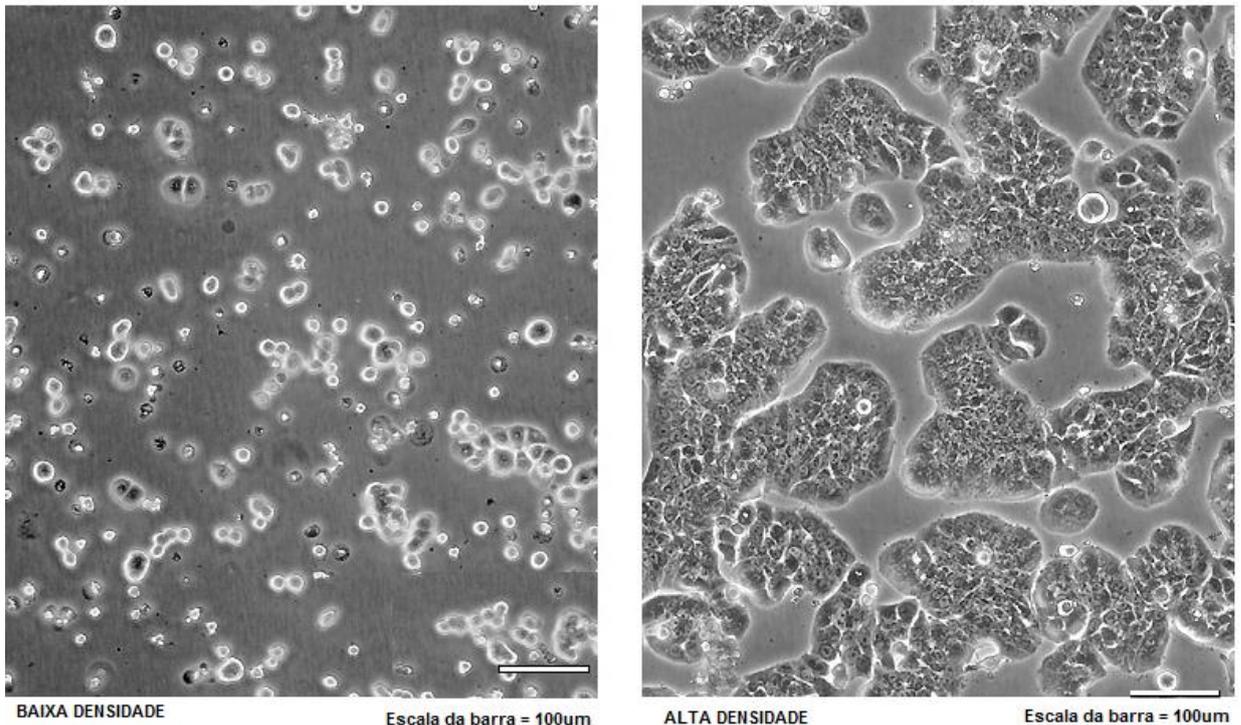


Figura 5. Imagem microscópica das células HT-29 em baixa e alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC).

As células HT-29 expressam receptores de uroquinase, mas não possuem atividade detectável do fator ativador de plasminogênio (REITER et al., 1993). São negativas para CD4, mas possuem uma expressão na superfície da célula de galactose ceramida (um possível receptor alternativo para o HIV). A linhagem HT-29 expressa, ainda, os genes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis e os oncogenes fos (FOGH, 1975; CHEN et al., 1987).

Na linhagem celular HT-29 o antígeno da proteína p53 é produzido em excesso. Consequentemente, os efeitos de indução da apoptose, mediados pela proteína p53, estão inativados garantindo a sobrevivência da célula (FOGH, 1975; CHEN et al., 1987).

Em nosso estudo foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 para o estudo da captação intestinal dos ácidos cafeico e 5-cafeoiquinico e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal.

A origem da linhagem HT-29 e a escassez de trabalhos em relação a mesma e aos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico foram determinantes na escolha desta linhagem para o estudo.

2.4 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

O termo ácido clorogênico (CGA) parece ter sido introduzido em 1846 para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura desconhecida na época, que conferia cor verde ao meio aquoso levemente alcalino e exposto ao ar (DE MARIA E MOREIRA, 2004). Em 1907 este ácido foi isolado na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. A estrutura química para este composto foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como ácido 5-cafeoilquínico). Mais tarde, outros compostos fenólicos ácidos foram isolados, caracterizados quanto à estrutura química e agrupados na mesma família (CLIFFORD et al., 2000).

De acordo com a sistematização de Clifford (1979), os ácidos clorogênicos (CGA) são descritos como sendo um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros, formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos: o ácido caféico (CA), o ferúlico (FA), ou o ρ -cumárico (ρ -CoA).

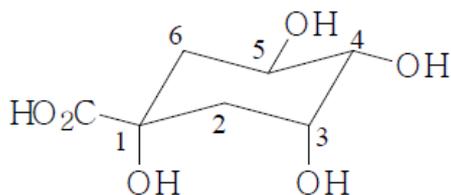
Estes grupos são: (i) ácidos cafeoilquínicos (CQA), formados pela esterificação do ácido quínico com uma molécula do ácido cafeico, com três isômeros principais, 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA; (ii) ácidos dicafeoilquínicos (diCQA), formados pela esterificação do ácido quínico com duas moléculas de ácido cafeico, cujos isômeros principais são 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA; (iii) ácidos feruloilquínicos (FQA), formados pela esterificação do ácido quínico com uma molécula do ácido ferúlico, com três isômeros principais, 3-FQA, 4-FQA e 5-FQA; (iv) ácidos ρ -cumaroilquínicos (CoQA), formados pela esterificação do ácido quínico com uma molécula do ácido ρ -CoA, com três isômeros principais, 3-CoQA, 4-CoQA e 5-CoQA e, (v) ácidos cafeoilferuloilquínicos (CFQA), formados pela esterificação do ácido quínico com uma molécula do ácido cafeico e ferúlico.

Dentre os isômeros de CGA, o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), sintetizado a partir da esterificação de uma molécula do ácido cafeico com o ácido quínico, na

posição 5 do anel aromático, é um dos compostos mais abundantes e mais encontrados nos alimentos (MANACH et al., 2004; HIGDON & FREI, 2006).

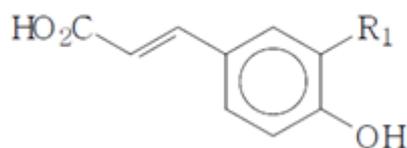
Nas Figuras 6 estão ilustradas as estruturas químicas dos precursores dos ácidos clorogênicos e do 5-CQA.

a)



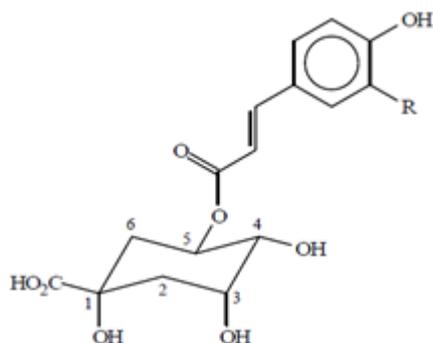
Ácido quínico

b)



R₁ = OH = ácido cafeico
R₁ = OCH₃ = ácido ferúlico
R₁ = H = ácido p-cumárico

c)



R = OH = 5-CQA
R = OCH₃ = 5-FQA

Figura 6. Estrutura química do ácido quínico (a), dos ácidos hidroxicinâmicos (b) e exemplo de um isômero de um monoéster do ácido clorogênico (c). Fonte: Rocha et al., 2012.

Os CGA estão presentes na maioria das espécies do reino vegetal, onde exercem a função de proteção contra predadores e microorganismos e são precursores metabólicos na biossíntese da parede celular e do controle da germinação e do crescimento celular, através da regulação dos níveis de ácido indol acético, um hormônio de crescimento vegetal (FARAH & DONANGELO, 2006).

Em relação às fontes alimentares, os CGA são abundantes em grãos de café, ervas medicinais, própolis, maçãs, frutas vermelhas e, em alguns vegetais, tais como, batata doce e cenoura (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de ácidos clorogênicos em diferentes alimentos*.

Alimento	Total CQA	Total di-CQA	Total CGA
<i>C. canephora</i> torra média (Brasil) ¹	1482,4	140,8	1623,2
<i>C. arabica</i> torra média (Brasil) ¹	1068,2	90,0	1158,2
Casca de batata doce ²	436,0	603,0	1039,0
Própolis ³	715,2	265,0	980,2
Ameixa seca ²	955,0	10,0	965,0
Uva ²	162,0	20,0	182,0
Pêra ²	155,0	15,0	170,0
Cereja ²	135,0	2,0	137,0

* Resultados expressos em mg 100g⁻¹

¹FARAH, et al., 2006.

²Sondheimer, 1958.

³Pereira *et al.*, 2003.

2.4.1 Absorção, biodisponibilidade e distribuição dos ácidos clorogênicos no organismo

Apesar dos vários estudos realizados *in vitro*, *in vivo* e em modelos animais no intuito de avaliar as propriedades biofarmacológicas dos CGA, dados sobre sua biodisponibilidade em humanos ainda são escassos.

Até pouco tempo, apenas traços de CA e/ou 5-CQA haviam sido identificados no plasma de animais e humanos (LAFAY et al., 2006a; WITTEMER et al., 2005; OLTHOF et al., 2003; RICE-EVANS et al., 2000; CHOUDHURY et al., 1999). No entanto, atualmente sabe-se que a absorção dos CGA é muito superior ao que se pensava e estudos demonstraram que alguns indivíduos parecem ser capazes de absorver até 73% do total de CGA ingerido (FARAH et al., 2008).

De acordo com trabalhos descritos na literatura, os CGA parecem seguir a mesma rota de absorção e metabolização de outros polifenóis (OLTHOF et al., 2003; MANACH et al., 2004). Sua absorção parece ocorrer no intestino delgado ou no cólon e, uma vez absorvidos seriam transportados para o fígado, tecidos extra-hepáticos ou rim, onde seriam então excretados pela urina e pela bile. Segundo

Bravo (1998), a maioria dos polifenóis atinge a concentração plasmática máxima 1 a 2 h após a sua ingestão. Contudo, concentrações plasmáticas máximas para os CQA e diCQA já foram observadas 8 h após a ingestão de extrato seco de café verde (FARAH et al., 2008).

A concentração plasmática máxima do total de CGA no organismo humano foi descrita ser em torno de 15 $\mu\text{mol/L}$. Ao avaliar o principal isômero dos CGA, o 5-cafeoilquínico (5-CQA), sua concentração plasmática máxima é de cerca de 6 $\mu\text{mol/L}$. Além dos principais isômeros de CGA, sabe-se que alguns dos seus metabólitos (ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e *p*-cumárico) também são biodisponíveis no organismo humano em concentrações plasmáticas máximas em torno de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (FARAH et al., 2008; MONTEIRO et al., 2007).

Estudos sugerem pouca ou nenhuma modificação dos compostos fenólicos, incluindo os CGA, durante a mastigação (FARAH, 2004). Também é conhecido que os CGA e outros cinamatos não sofrem hidrólise pelo suco gástrico (LAMBERT et al., 1999; RECHNER et al., 2001; FARAH, 2004). Portanto, durante o processo de digestão esses compostos parecem seguir íntegros em direção ao intestino delgado, onde seriam conjugados, absorvidos e/ou parcialmente degradados (DUARTE & FARAH, 2011; MARQUES & FARAH, 2010; MONTEIRO et al., 2010a; FARAH, 2004). Choudhury et al. (1999) sugeriram que em ratos, pelo menos uma pequena porção do 5-CQA ingerida é absorvida, preferencialmente pelo jejuno em relação ao íleo. Além disso, ao avaliar o efeito de fluidos digestivos sobre os CGA do café, Farah (2004) observou que os fluidos entéricos com pH alcalino, tenderam a ocasionar isomerização e hidrólise dos CGA do café, intensificadas à medida que o pH e o tempo de exposição é aumentado. No entanto, mesmo após 8 h de digestão, cerca de 80% dos CGA ainda permaneceram intactos (FARAH, 2004).

Recentemente, Farah et al. (2008) e Monteiro et al. (2007) demonstraram, pela primeira vez, que os nove principais isômeros de CGA (3-, 4- e 5-CQA, 4- e 5-FQA, 3,4-; 3,5-; e 4,5-diCQA) são biodisponíveis no organismo humano. Os resultados observados por Monteiro et al. (2007) e Farah et al. (2008) indicaram que um pequeno percentual do CGA ingerido é absorvido no estômago, sendo a maior parte absorvida e metabolizada no intestino delgado. Olthof et al. (2003), ao avaliar a biodisponibilidade dos CGA em pacientes ileostomizados após o consumo de 5-CQA, relatou que em média 67% do 5-CQA ingerido foi recuperado nos fluidos

intestinais. Estimou-se, portanto, que 33% do 5-CQA foi absorvido por estes pacientes. Estes resultados corroboram com o estudo de Farah et al. (2008) no qual relataram em média 33% de biodisponibilidade aparente dos CGA em humanos.

Os CGA não absorvidos pelo intestino delgado parecem seguir até o intestino grosso, onde sofreriam a ação de bactérias. De fato, Couteau et al. (2001) descreveram que um grande número de bactérias intestinais expressam atividade de esterase e, portanto, seriam capazes de hidrolisar os CGA, produzindo ácido cafeico e outros metabólitos no intestino grosso, que seriam então absorvidos nessa porção do organismo humano. Estas esterases são capazes de liberar a molécula do ácido cinâmico da estrutura do CGA, que a seguir podem ser absorvidos e metabolizados aos seus metabólitos primários (ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e *p*-cumárico) (COUTEAU et al., 2001).

Contudo, o mecanismo de absorção dos CGA pelos enterócitos ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que alguns compostos fenólicos apresentam mecanismo de transporte ativo através de afinidade pelo transportador do ácido monocarboxílico (MCT), parecendo, entretanto, haver uma diversidade nas características de absorção desses compostos (KONISHI et al., 2003).

Em cultura de células intestinais humanas Caco-2, observou-se que o fluxo transepitelial do 5-CQA é significativamente menor que o fluxo do CA que, por sua vez, é menor que o do FA, o que pode ser explicado, em parte, pela via de transporte dos compostos através das membranas celulares: os CGA são absorvidos apenas por transporte paracelular, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos livres são absorvidos também por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos (KONISHI et al., 2006). Estes transportadores estão presentes na mucosa gastrointestinal e em diversos tecidos corporais e, portanto, poderiam participar também do transporte dos ácidos fenólicos em tecidos alvo (KARAKAYA, 2004).

Konishi e Kobayashi (2004) sugeriram que o 5-CQA penetra na célula intestinal por difusão passiva, enquanto o CA, além de entrar por difusão passiva utiliza também o MCT.

Parte dos CGA parecem ser absorvidos diretamente pelo sistema porta seguindo até o fígado, onde seriam então metabolizados, armazenados e/ou liberados gradativamente pela bile para a circulação entero-hepática (OLTHOF et al.,

2003; FARAH, 2004; MANACH et al., 2004). De fato, a presença dos isômeros dos CQA e diCQA e dos ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico livres em saliva, fluidos gástricos e entéricos de humanos após 12 h de jejum já foi relatada na literatura (FARAH, 2004; MONTEIRO & FARAH, 2008). Isto sugere que o 5-CQA poderia estar sendo armazenado de alguma forma no organismo humano e à medida que o organismo necessitasse, eles seriam liberados através da circulação entero-hepática.

Ao contrário dos fluidos digestivos, a urina parece não ser a principal rota de excreção da forma intacta de CGA em humanos (FARAH et al., 2008), visto que somente pequenas concentrações dos isômeros 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA foram identificados na urina de humanos (MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008; DUARTE & FARAH, 2011; MARQUES & FARAH, 2010; MONTEIRO et al., 2010). Os CGA e seus metabólitos circulantes após serem absorvidos seguiriam até o rim onde poderiam ser metabolizados e excretados, principalmente na forma de metabólitos através da urina. Mais de 30 metabólitos já foram identificados na urina de humanos após a ingestão de CGA, sendo os ácidos hipúrico, ferúlico, isoferúlico, dihidroferúlico, dihidrocafeico, gálico, sinapínico, vanílico, *p*-hidroxibenzóico e *m*-hidroxihipúrico, entre outros, os principais metabólitos dos CGA (RECHNER et al., 2001; OLTHOF et al., 2003; MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008; DUARTE & FARAH, 2011; MARQUES & FARAH, 2010).

Considerando que somente pequenas concentrações de CGA na urina após a ingestão de café foram relatadas na literatura (MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008; DUARTE & FARAH, 2011; MARQUES & FARAH, 2010), é possível que os fluidos digestivos constituam a principal rota de excreção de formas intactas de CGA (FARAH et al., 2006a; MONTEIRO & FARAH, 2008).

As Figuras 7 e 8 ilustram, respectivamente, os possíveis mecanismos de absorção dos CGA e dos ácidos hidroxicinâmicos livres (PLUMB et al., 1999) e a gama dos possíveis metabólitos que podem ser formados a partir da metabolização dos CGA (CHOUDHURY et al., 1999).

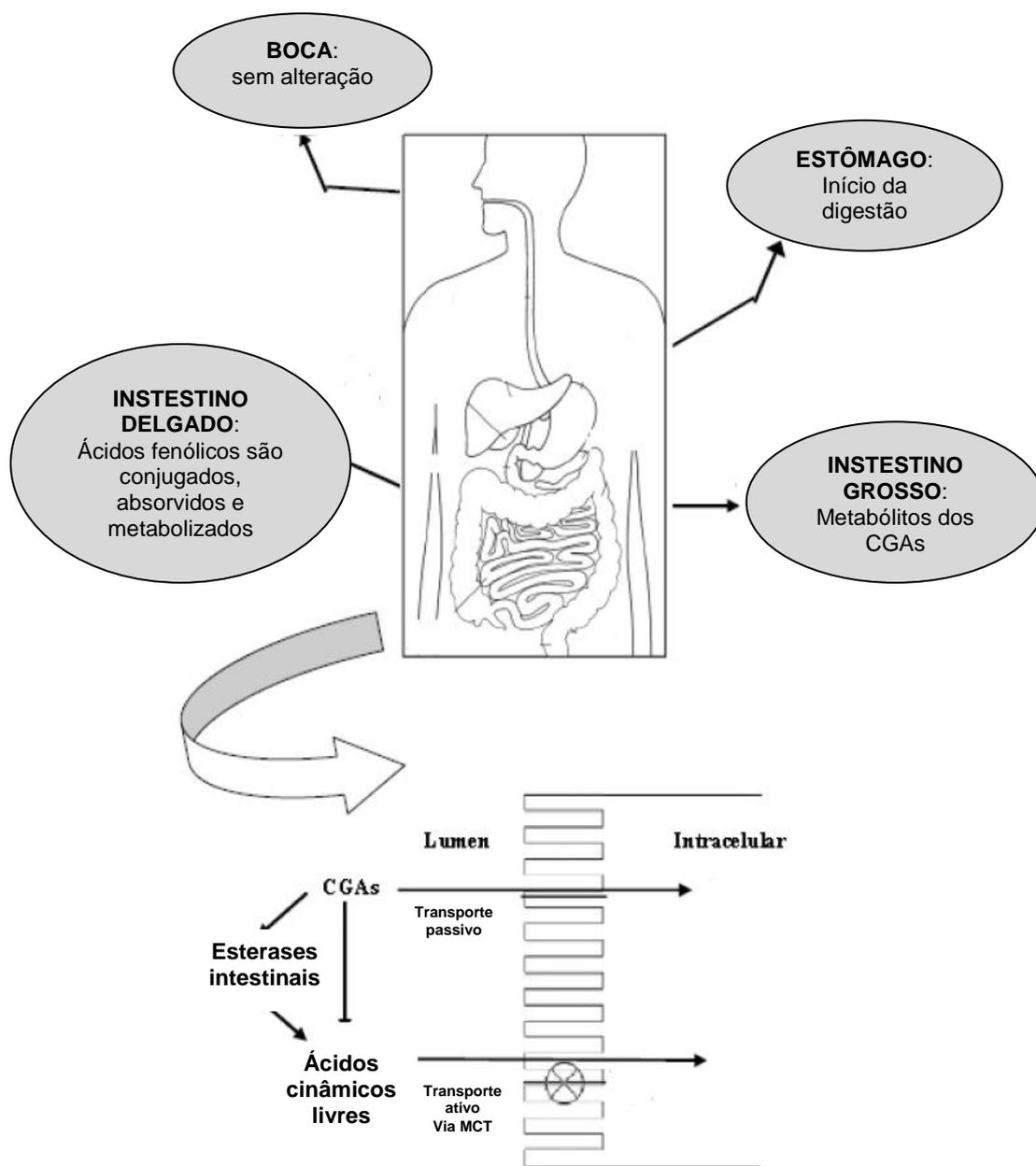


Figura 7. Possível rota de absorção dos ácidos clorogênicos e ácidos hidroxicinâmicos livres (Rocha et al., 2012).

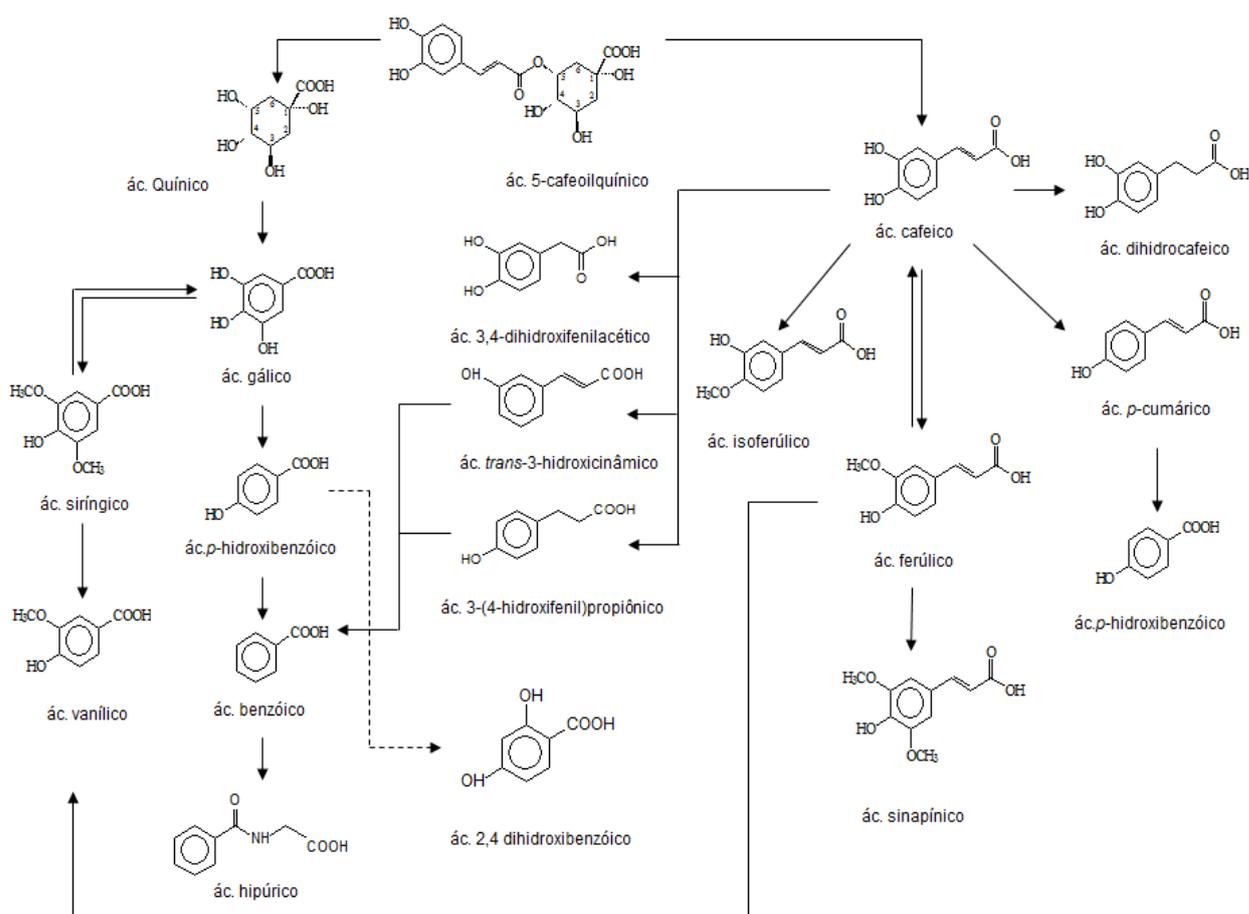


Figura 8. Esquema proposto para o metabolismo dos ácidos clorogênicos (Duarte & Farah, 2011; Monteiro, 2010a).

2.4.2 Propriedades bioativas dos ácidos clorogênicos

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm sugerido que os CGA estariam relacionados com a redução do risco relativo do desenvolvimento de diversas doenças, entre elas: hipertensão arterial (GARAMBONE & ROSA, 2007; WATANABE, 2006), doenças coronarianas (BONITA et al., 2007), diabetes mellitus tipo 2 (VAN DAM, 2006; SALAZAR-MARTINEZ, 2004), doença de Alzheimer (LINDSAY, 2002), câncer de cólon (CAVIN, 2002); cirrose hepática e câncer de fígado (KLATSKY, 2006; LARSSON & WOLK, 2007; CORRÃO, 2001); além de alcoolismo, depressão e suicídios (FLORES et al., 2000).

Com base nos estudos epidemiológicos, ensaios *in vivo* e *in vitro* também têm sido realizados no intuito de confirmar essas propriedades. Algumas das propriedades biofarmacológicas atribuídas aos CGA após a realização de estudos *in vivo* e *in vitro* incluem: atividade antioxidante (PELLEGRINI et al., 2003), atividade antiviral contra o vírus da herpes e alguns tipos de adenovírus (CHIANG et al., 2002); atividade antibacteriana contra enterobactérias (ALMEIDA et al., 2006) e bactérias cariogênicas (ANTÔNIO et al., 2010); atividades hepatoprotetora (BASNET et al., 1996); imuno-estimulante (TATEFUJI et al., 1996); anti-hipertensiva (KOZUMA et al., 2005) e hipoglicemiante (BELKAID et al., 2006); efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos, e potencial aumento da imunidade (FARAH, 2004), característica anti-mutagênica (WOOD et al., 1982) e neuroprotetora (KIM et al., 2005). Os principais papéis desempenhados por estes compostos seguem ilustrados na Figura 9.

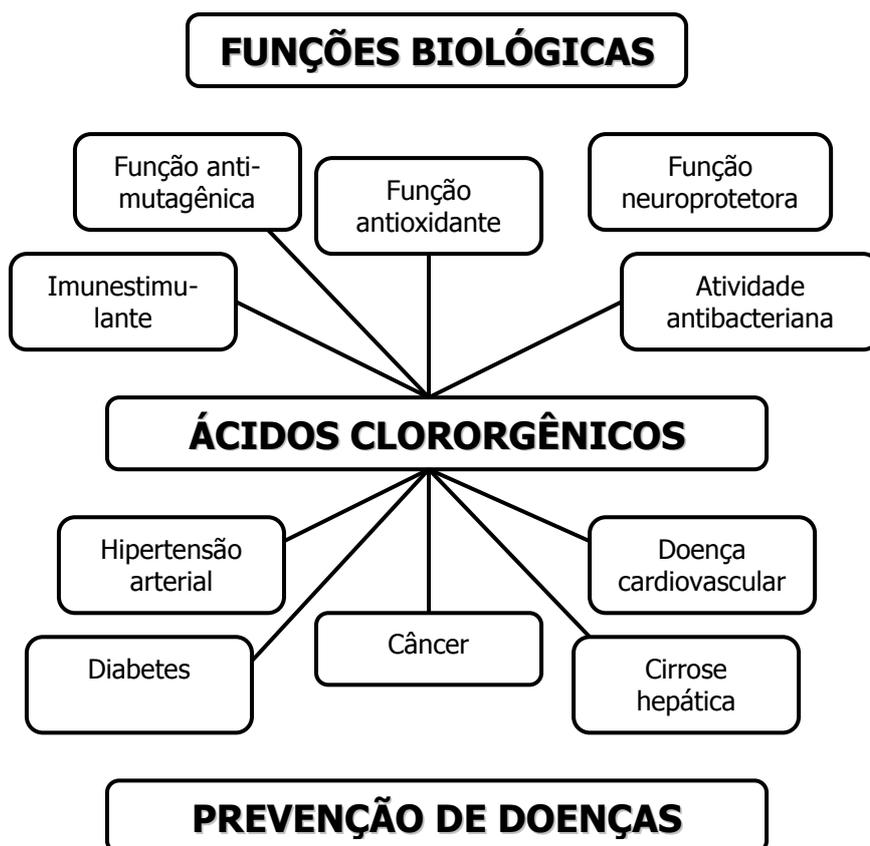


Figura 9. Principais papéis dos ácidos clorogênicos na prevenção de doenças.

Das diversas propriedades farmacológicas atribuídas aos CGA, a atividade antioxidante tem sido bastante estudada e estaria relacionada à proteção contra os danos provocados pelo estresse oxidativo, processo que leva à degeneração celular e que tem sido relacionado com diversas doenças, entre elas o câncer (ULLMAN & ITZKOWITZ, 2011). A capacidade dos CGA em eliminar os radicais livres e metais pró-oxidantes, em parte, explica a associação destes compostos com a prevenção das diferentes patologias. Comparando-se o poder redutor dos ácidos hidroxicinâmicos, o ácido cafeico provou ser um antioxidante superior comparado com os ácidos p-cumárico e ferúlico, inibindo a oxidação de LDL, sequestrando radicais livres e o oxigênio singlete (GULCIN, 2006), além de inibir a formação de compostos carcinogênicos (TAPIERO, et al., 2002).

Evidências recentes sugerem que os CGA podem também atuar através de outros mecanismos, além da capacidade antioxidante, modulando a atividade de algumas enzimas específicas e inibindo a proliferação celular (MANACH, 2004) (Figura 10).

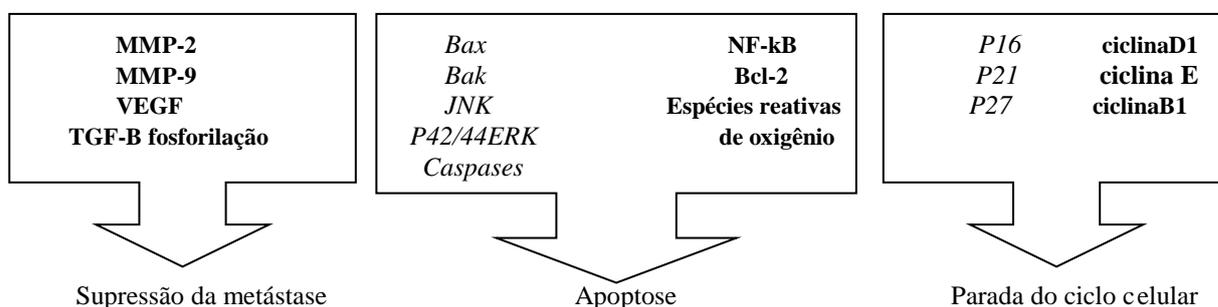


Figura 10. Mecanismo potencial da atividade anti-câncer dos ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico. As moléculas sinalizadoras que estão sendo ativadas pelos compostos estão expostas em itálico, enquanto que aquelas que estão sendo suprimidas estão expostas em negrito (Rocha et al., 2012).

Morishita et al. (1997) observaram em ratos que o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) foi capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas denominadas focos de criptas aberrantes (FCAs), além de poder regredi-las. Posteriormente, Mori et al. (2000) observaram que o 5-CQA e o FA foram capazes de inibir a formação de FCAs e a carcinogênese colorretal em ratos e, portanto poderiam exercer efeito na prevenção de câncer colorretal em humanos. Recentemente, Kurata et al. (2007) demonstraram que alguns isômeros dos CGA

presentes na batata doce foram capazes de suprimir a mutação de células normais, bem como o crescimento de células, em especial câncer de estômago e cólon, por indução da apoptose.

Estudo conduzido por Kasai et al. (2000), com intuito de identificar a presença de compostos com atividade antioxidante em vegetais e frutas que pudessem inibir dano oxidativo ao DNA de ratos, demonstrou que os CGA encontrados nos extratos de cenoura, bardana, damasco e ameixa preta são potentes inibidores da peroxidação lipídica *in vitro*. Além disso, o nível de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), marcador de estresse oxidativo celular durante a carcinogênese, foi menor nos tecidos tratados com CGA, demonstrando, portanto, possível ação anticarcinogênica, também, *in vivo*.

2.4.3 Ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico: potentes compostos bioativos

Apesar da grande quantidade de pesquisas e do grande desenvolvimento na última década, o câncer ainda é a principal causa de morte em muitos países de alta renda e está prestes a se tornar a principal causa de morbidade e mortalidade nas próximas décadas em todas as regiões do mundo. Em função disto, uma atenção considerável tem sido focada na quimioprevenção como uma abordagem alternativa para o controle e prevenção do câncer de cólon (KANG et al., 2011).

Evidências de que os ácidos hidroxicinâmicos, entre eles o 5-CQA e CA, podem ter um potencial efeito inibitório na invasão e metástase de cânceres de cólon vem sendo cada vez mais relatada na literatura científica (WENG & Yen, 2012).

Jaganathan & Mandal (2009) demonstraram que o CA promoveu um efeito inibitório dose-dependente sobre a proliferação de células HepG2. Nestas células, o CA, em uma concentração de 200 µg/mL, foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 61% comparado com o controle. O CA suprimiu a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9), bloqueando a atividade do NF-κB. Tais dados reforçam os resultados obtidos por Rao et al. (1992), onde o CA, em uma

concentração de 2500 μM , demonstrou inibir em 50% o crescimento de células de adenocarcinoma de cólon HT-29.

Da mesma forma, Chang et al. (2010) demonstraram, em seu estudo, que o CA reduziu, significativamente, a proliferação de células HeLa (células de adenocarcinoma cervical), em uma concentração também dose-dependente. Evidências morfológicas de apoptose, como fragmentação nuclear, foram claramente observadas após 24 h e 48 h de exposição ao composto (1 mM e 10 mM). O CA foi capaz de induzir a apoptose através da inibição da atividade da Bcl-2, promovendo a liberação do citocromo-c e, subsequente ativação da caspase-3, indicando, portanto, que este composto induz a apoptose através da via mitocondrial. Isto sugere, portanto, que o CA possui um forte efeito anti-tumoral, podendo ser um promissor agente quimiopreventivo ou quimioterapêutico.

Weng & Yen (2012) demonstraram, ainda, que o CA foi capaz de suprimir a invasão de células AH109A in vitro (células de câncer hepático), além de inibir a expressão das MMP-9 em células Hep3B (carcinoma hepatocelular).

Diante destas evidências, torna-se necessária a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da captação intestinal dos ácidos clorogênicos e hidroxicinâmicos e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação dessa classe de compostos fenólicos na prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a influência dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico no crescimento e captação celular em linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, em diferentes concentrações;
- Avaliar a cinética de captação, em função do tempo de incubação, dos padrões dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico isolados, em culturas de células HT-29;
- Avaliar o efeito da incubação isolada dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, em função do tempo de incubação e da concentração, sobre a viabilidade celular de linhagem de células HT-29;
- Avaliar os efeitos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre as modificações no ciclo celular e no processo de morte celular em linhagem de células HT-29.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os padrões comerciais dos ácidos cafeico, 5-cafeoilquínico, ferúlico (FA), isoferúlico (IsoFA), *p*-cumárico (*p*-CoA), dihidrocafeico (DHCA), vanílico (VA), gálico (GA), siríngico, sinápico, *trans*-3 hidroxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, 3,4-dihidroxifenilacético, 2,4-dihidroxibenzóico, 3-(4-hidroxi)-fenilpropionico e 4-hidroxifenilacético foram adquiridos da Sigma-Aldrich, bem como, meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), tripsina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tampão hepes e albumina de soro bovino.

O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da LaborClin (Campinas, SP, Brasil) e, os frascos de cultura de células e raspadores de células foram obtidos da Nunc (Roskilde, Dinamarca).

Também foram adquiridos da Sigma os seguintes reagentes: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), metanol, 2,2'-azinobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), Fluoresceína sódica, Trolox, 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium (TPTZ), fosfato de sódio monobásico monohidratado, acetato de sódio anidro, cloreto de ferro e sulfato de ferro.

Todos os reagentes e compostos utilizados tinham grau de pureza analítica.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CA E 5-CQA ISOLADOS

A determinação da atividade antioxidante foi avaliada através de três métodos distintos: método DPPH, capacidade ferri-redutora (FRAP) e a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC).

4.2.1 Método DPPH

O método DPPH, adaptado por Sánchez-Moreno et al. (1998), é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por compostos com atividade antioxidante, através do decréscimo da absorbância. O radical DPPH possui uma coloração violeta e, quando reduzido passa a ter coloração amarelada. Quando

ocorre a adição de uma substância antioxidante ao meio, capaz de ceder elétron neutralizando esse radical livre, ocorre o decréscimo da absorvância, monitorada a 515 nm.

Para as análises, inicialmente, foi preparado uma solução estoque de DPPH na concentração de 0,06 mM. A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho de DPPH, nas seguintes concentrações: 5 µM, 12,5 µM e 25 µM. Em ambiente escuro, uma alíquota de, aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH foi transferida para cubeta de vidro e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm. A partir das concentrações de DPPH e das respectivas absorvâncias foi calculado a equação da reta da curva padrão de DPPH.

Para a determinação da atividade antioxidante das amostras pelo método DPPH foram pesados 3,5 mg de 5-CQA e 2,0 mg de ácido cafeico e, diluídos, separadamente, em 10 mL de água destilada estéril. Alíquotas de 3,0 mL de DPPH da solução padrão foram, então, transferidas para tubos de ensaio e, acrescentadas a quantidade de cada composto referente às concentrações a serem analisadas (1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM; 40 µM e 80 µM). As amostras foram mantidas em ambiente na ausência da luz e, no momento da leitura foram homogeneizadas em agitador de tubos.

As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, sendo observada a redução da absorvância até a sua estabilização. A leitura da absorvância final para o cálculo do IC50 só foi realizada após a estabilização da absorvância.

A porcentagem de DPPH remanescente foi calculada da seguinte forma: % de DPPH remanescente = $100 \times [\text{DPPH}]_{\text{remanescente}} / [\text{DPPH}]_{\text{inicial}}$.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (IC50). Portanto, quanto maior a capacidade antioxidante dos compostos encontrados nas amostras estudadas, maior será a neutralização do reagente DPPH e, portanto, maior será a perda da coloração violeta identificada pelo espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como percentual de redução do DPPH em relação à ação do 5-CQA e CA.

4.2.2 Método FRAP

Para análise da atividade antioxidante dos compostos pelos métodos FRAP e ORAC, 0,002g de ácido cafeico e 0,0035g de 5-CQA foram pesados e, diluídos, separadamente, em 100 mL de água Milli-Q. Diluições sucessivas foram realizadas, a fim de se obter as concentrações desejadas para as análises: 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 e 80 μM .

A capacidade ferri-redutora (FRAP) foi determinada pelo método adaptado de Benzie & Strain (1996).

O método FRAP baseia-se na redução, a baixo valor de pH, de Fe^{+3} -tripiridiltriazina ao complexo Fe^{+2} -tripiridiltriazina de coloração azul, na presença do reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium (TPTZ), por redutores, no caso os antioxidantes das amostras. A mudança de cor é monitorada pela leitura da absorbância a 593 nm.

O reagente de FRAP foi preparado através da mistura do agente oxidante, o TPTZ, a 20 mL do tampão acetato 300 mM (pH 3,6) e 2.0mL de cloreto de ferro (20 mM). Para obtenção da curva padrão, foram preparadas soluções de sulfato de ferro a 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{mol/L}$. Os compostos (5-CQA e CA), por sua vez, foram pesados e diluídos em água Milli-Q, de forma a se obter concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 e 80 μM .

Para a determinação do FRAP, o reagente de FRAP foi armazenado em banho-maria a 37°C e, a leitura do branco foi realizada a 593 nm. Após, 20 μL de água Milli-Q, 20 μL das diferentes concentrações do padrão, 20 μL das diferentes concentrações de cada amostra e 180 μL do reagente de FRAP foram adicionados a uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis a 593 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

O complexo Fe^{2+} -TPTZ formado pela redução do íon férrico possui coloração azul intensa que foi monitorada por 4 minutos a 593 nm (Equipamento Victor3, Perkin Elmer, Modelo 1420 Multilaber Counter). Os valores de FRAP foram obtidos pela comparação da absorbância do CA e 5-CQA analisados com as obtidas pela curva-padrão de sulfato ferroso, e expressos em μmol de Fe^{2+}/L de amostra.

4.2.3 Método ORAC

A capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC) foi determinada pelo método adaptado de Prior et al. (2003), utilizando-se fluoresceína como molécula fluorescente em fluorímetro de microplaca.

Para as análises, 100 µL de fluoresceína (7,8 µM) e 150 µL do tampão fosfato foram adicionados a microplaca e a leitura foi realizada durante 15 minutos a 37 °C.

Após, 100 µL do composto (5-CQA ou CA), em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 e 80 µM), 100 µL dos padrões (concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20; 40 e 80 µM) e 100 µL do tampão fosfato foram adicionados a microplaca, todos em triplicata. Em todos os poços, foi adicionado, em seguida, 100 µL da solução de fluoresceína. A microplaca contendo a amostra, os padrões e tampão foi incubada por 15 minutos a 37 °C, antes da injeção automática do AAPH (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidroclorato).

Foi realizada leitura em espectrofotômetro, com leitor de microplaca, mediante injeção automática do sistema de 50 µL da solução de AAPH. A leitura da fluoresceína foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, com um espaço de 30s entre uma leitura e outra. Antes e após cada injeção, foi realizada a limpeza da bomba de injeção com a solução de AAPH.

A partir dos dados de absorbância em relação aos tempos obtidos, foi calculada a área abaixo da curva (AUC). A atividade antioxidante do composto foi determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo.

Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão foi gerada e a atividade antioxidante do composto foi calculada. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox/g.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). A cultura de células HT-29 foi realizada em frascos próprios para

cultura, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de duas vezes por semana. Para cada experimento, as células foram semeadas em concentração de $1,0 \times 10^4$ células/cm² em placas de 06 e 96 poços, durante as análises de ciclo celular, apoptose, captação celular e viabilidade celular, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 INCUBAÇÃO DOS COMPOSTOS EM LINHAGEM DE CÉLULA HT-29

Para preparo das soluções dos compostos, 2,0 mg de CA e 3,5 mg de 5-CQA foram pesados e, diluídos, separadamente, em 10 mL de meio de cultura estéril, obtendo-se, assim, soluções com concentrações de 1,1 mM e 0,99 mM, respectivamente.

As células HT-29 com 10 dias de confluência foram incubadas separadamente com os compostos, em diferentes concentrações (1,25 µM a 80 µM), dependendo do experimento a ser realizado. Para análises de viabilidade celular as células HT-29 foram incubadas com os compostos nas concentrações de 1,25 µM a 80 µM. Para as análises de ciclo celular e apoptose, as células foram incubadas com 5 µM e 10 µM de CA e 5-CQA. Já, para as análises de captação celular foi utilizada a concentração de 5 µM, por ser esta uma concentração fisiológica de ambos os compostos. Grupos controle (sem incubação com os compostos) foram incluídos em cada placa para todos os experimentos. Os tempos de incubação estudados foram de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após início da incubação para análises de viabilidade celular. Para análises de ciclo celular e apoptose foram avaliados os tempos de incubação de 48 h e 96 h. Já, para as análises de captação celular foram avaliados os tempos de 0,5 h; 1 h; 2 h; 6 h; 12 h; 24 h; 48 h; 72 h e 96h.

Os meios de cultura foram trocados a cada 24 h e, os compostos reincubados durante este procedimento.

4.5 DOSAGEM DO CA, 5-CQA E METABÓLITOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON (HT-29)

4.5.1 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nos tempos previamente determinados (0-96 h), os meios de cultura (sobrenadante) das placas controle e das contendo as culturas de células incubadas com CA e 5-CQA, na concentração de 5 μM , foram recolhidos, armazenados em tubos tipo eppendorf estéreis e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. As células, por sua vez, foram descoladas da placa de cultura por ação de *cells scrapers* (pequenos rodos), mediante a adição de 500 μL de BSS-CMF. O precipitado celular das células controle e tratadas também foram recolhidos e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Após descongelamento, 350 μL do precipitado celular e meio de cultura foram adicionados a um tubo tipo eppendorf e 250 μL de solução aquosa de Metanol (60:40, v:v) foram adicionados. Posteriormente, a mistura foi agitada em vórtex durante 1 minuto e centrifugada a 13000 *rpm* por 5 minutos. 50 μL do sobrenadante foi analisado por CLAE.

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com adaptações do método descrito por Farah et al. (2008) e Monteiro et al. (2007). O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20A_{HT}, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A₅. A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 μm , 250 mm \times 4,6 mm, Kromasil[®]), acoplada a uma pré-coluna C-18 (5 μm , 10mm \times 3 mm, Kromasil[®]). A fase móvel utilizada foi uma mistura binária de ácido fórmico aquoso 0,3% (eluente A) e metanol (eluente B). O eluente foi monitorado a 325 nm e 280 nm e o gradiente de concentração da fase móvel foi programado utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min, da maneira apresentada na Tabela 6, a seguir:

Tabela 6. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com o ácido cafeico e 5-cafeoilquínico.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,01	78	22
9,0	78	22
14,0	68	32
25,0	65	35
35,0	55	45
40,0	55	45
45,0	78	22

Os padrões externos de 5-CQA, CA, FA, IsoFA, *p*-CoA, DHCA, VA, ácidos gálico, siríngico, sinápico, *trans*-3 hidroxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, 3,4-dihidroxifenilacético, 2,4-dihidroxibenzóico, 3-(4-hidroxi)-fenilpropiónico e 4-hidroxifenilacético, na concentração individual de 10 µg/ml, foram injetados na forma de *pool* no início e no final de cada dia de trabalho.

A mistura de 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA foi preparada a partir do padrão comercial de 5-CQA usando o método de isomerização descrito por Trugo e Macrae (1984).

A quantificação dos diferentes isômeros de CGA foi obtida por comparação da área dos picos dos componentes nas amostras com a área do pico referente ao padrão externo do 5-CQA, corrigidas pelos respectivos coeficientes de extinção molar, seguindo-se metodologia descrita na literatura por Ruback (1969).

A identificação e a quantificação dos ácidos: 5-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, cafeico, 2,4-dihidroxibenzóico, dihidrocafeico e isoferúlico foram obtidas por comparação dos tempos de retenção (*Tr*) e da área dos picos dos componentes nas amostras com o *Tr* e a área do pico referente aos padrões externos.

4.5.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)

A análise por CLAE-EM foi utilizada para a confirmação dos compostos que foram previamente identificados na análise por CLAE, de acordo com Perrone et al. (2008). O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu, Kyoto, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-10ADvp, um forno para coluna CTO-10ASvp, um injetor manual 8125 (Rheodyne) equipado com um loop de 20 µL e um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10Avp. O sistema cromatográfico foi interligado a um espectrômetro de massas LC-MS 2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma fonte de íons do tipo *electrospray*.

A separação cromatográfica dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE Magic C30 (150 mm × 2,0 mm, 5 µm, Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA, EUA) mantida à temperatura constante de 40 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura binária de ácido fórmico aquoso 0,3% (eluente A) e metanol (eluente B). O gradiente de concentração da fase móvel foi programado utilizando-se fluxo de 0,2 mL/min, da maneira apresentada na Tabela 7, a seguir:

Tabela 7. Programação do gradiente de concentração da fase móvel utilizada na análise dos meios de culturas de células e dos precipitados celulares de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon incubadas com o ácido cafeico e 5-cafeoilquínico via CLAE-EM.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0,03	90	10
30,0	83	17
45,0	83	17
55,0	65	35
75,0	65	35
93,0	50	50
93,01	90	10
100	Stop	Stop

Os dados foram adquiridos utilizando-se o *software* LCMS solution (Shimadzu Corp., versão 2.00, 2000) para ambos os detectores de massas e de arranjo de diodos (aquisição entre 190 e 370 nm). A fonte de ionização foi operada no modo

negativo. O fluxo do gás de nebulização (N₂ ultra-puro) foi ajustado para 2,0 L/min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), de maneira a detectar os íons específicos demonstrados na Tabela 8, a seguir:

Tabela 8. Massas moleculares dos compostos monitorados por CLAE-EM.

Composto	Massa molecular
Ácidos cafeoilquínicos	353
Ácidos dicafeoilquínicos	515
Ácidos feruloilquínicos	366
Ácido 2,4-dihidroxibenzóico	153
Ácido siríngico	197
Ácido gálico	169
Ácido sinápico	223
Ácido vanílico	167
Ácido cafeico	179
Ácido <i>p</i> -cumárico	163
Ácido ferúlico	193
Ácido isoferúlico	193
Ácido dihidrocafeico	179
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	167
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	137

4.5.3 Determinação de proteína do precipitado celular e meio de cultura

Para dosagem do teor de proteína total nos precipitados celulares e nos meios de cultura foi utilizado o Kit “BCA - Protein Assay Kit” (Pierce, Rockford, IL / USA).

Para realização da análise, foram pipetados e adicionados em uma placa de 96 poços 25 µL do padrão de albumina (solução de BSA) ou 10 µL das amostras a serem analisadas e, a seguir, foram adicionados 200 µL de uma mistura composta pelos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹) e B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% *m/v*), sendo esta composta por cinquenta partes do reagente A com uma parte do reagente B.

A placa de Elisa contendo as amostras e os padrões de albumina foi agitada lentamente por 30s e incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro e a absorbância determinada no comprimento de onda de 570 nm. Todas as amostras e padrões foram preparados em triplicata. As concentrações das amostras foram obtidas com base na curva padrão de BSA.

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-*dimetil*-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Foram plaqueadas $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações de CA e 5-CQA, que variavam de 1,25 μM a 80 μM . Após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de incubação, foram adicionados 10 μL de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100 μL /poço de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (Bio-Rad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula: $\text{CPIR} = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$.

4.7 ENSAIO DE CICLO CELULAR

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspendidas em 500 μL de solução fria de Vindelov (Vindelov, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 $\mu\text{g/mL}$ iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos.

As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose (<2n), fase G0-G1 (2n), fase S (fase > 2n mas <4n), e fase G2/M (4n) foram adquiridos e analisados utilizando CellQuest. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com EXPO32 software de análise V1.2.

4.8 ENSAIO DE APOPTOSE

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspensas em 400 µL de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5 µL de anexina V FITC e 5 µL de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos e, os dados analisados em software Cell Quest.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes feitos em triplicata (n=9). A influência dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre a atividade antioxidante foi avaliada através do teste t de Student. O efeito do tempo de incubação e da concentração dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico nas culturas de células de adenocarcinoma de cólon (HT-29) sobre a viabilidade, ciclo celular e apoptose bem como o efeito do tempo de incubação sobre a captação celular foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. A análise de correlação de Pearson entre os diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante foi realizada. Dados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism (versão 5.0) e Statistica (versão 7.0, StatSoft Inc.). Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CA E 5-CQA ISOLADOS

A atividade antioxidante do CA e 5-CQA foram avaliadas por três diferentes métodos (DPPH, FRAP e ORAC) conforme descrito nos itens 4.2.1 à 4.2.3. Os resultados dos ensaios de DPPH, FRAP e ORAC estão apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14 para o 5-CQA e ácido cafeico.

Para os três métodos em estudo, os compostos foram analisados em concentrações que variaram de 1,25 μM a 80 μM . Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e até o término da reação.

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, foi elaborada a equação da reta ($y=0,0499+0,0132x$) e calculado o coeficiente de regressão linear ($r^2=0,9994$). Durante trinta minutos de ensaio, foi observado um aumento significativo na capacidade antioxidante com o aumento da concentração dos compostos analisados. Observou-se que após 20 minutos de ensaio, o percentual de redução do DPPH e, conseqüentemente, a atividade antioxidante de ambos os compostos tenderam a estabilização (Figuras 11A e 11B).

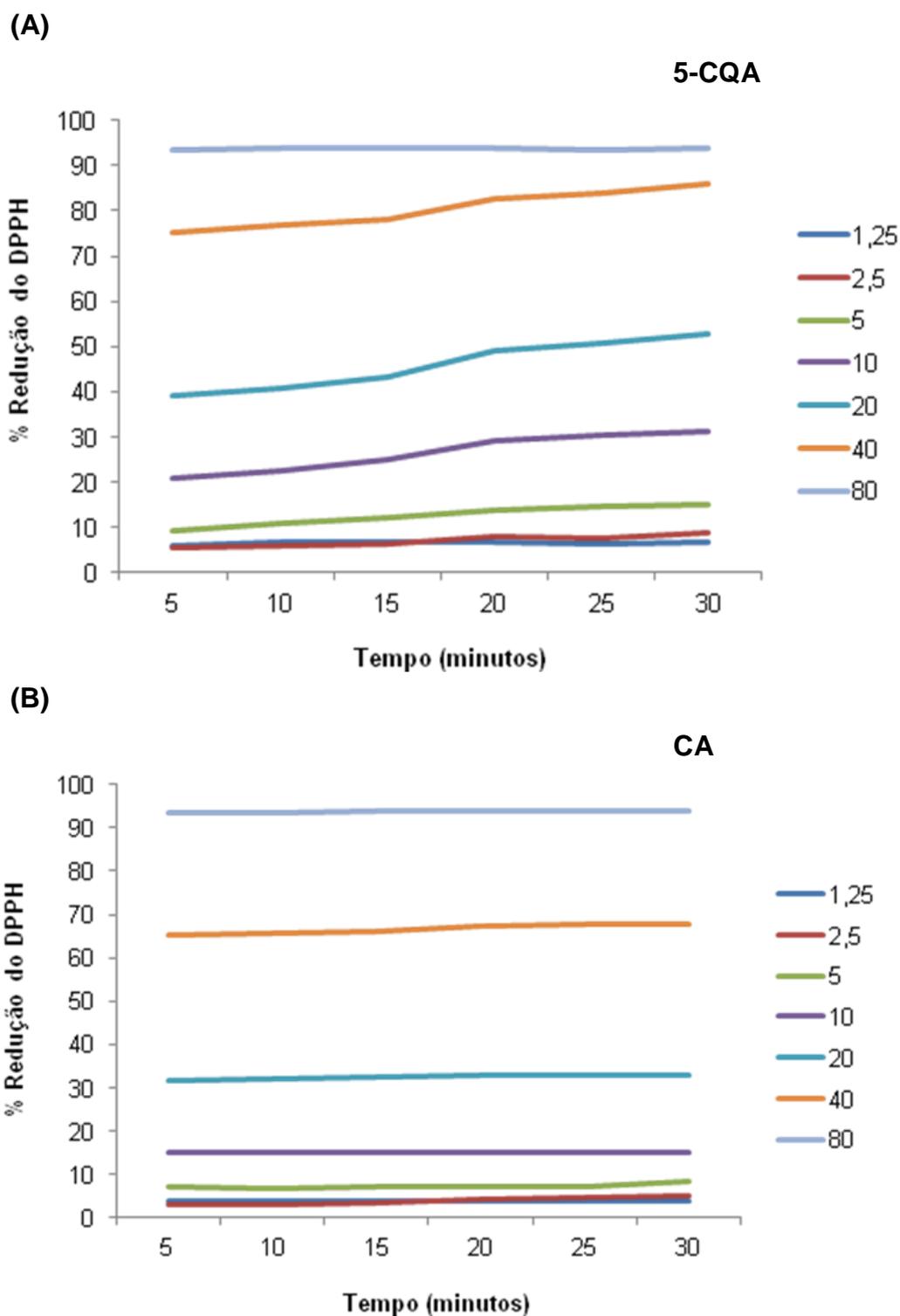


Figura 11. Percentual de redução do DPPH pela ação do 5-CQA (A) e CA (B) durante 30 minutos de ensaio. Valores expressos como médias das triplicatas.

Uma vez alcançada a estabilização da absorbância, o tempo máximo da reação (30 minutos) foi utilizado para análise da atividade antioxidante do CA e 5-CQA. Observou-se que o 5-CQA demonstrou, pelo método DPPH, uma atividade antioxidante superior à do CA, a partir da concentração de 5 μM . Esta diferença, contudo, não foi observada nas concentrações mais baixas (1,25 μM e 2,5 μM) e na concentração mais elevada (80 μM). Nestas concentrações não foi observada diferença significativa no percentual de redução do DPPH entre o CA e o 5-CQA (Figura 12).

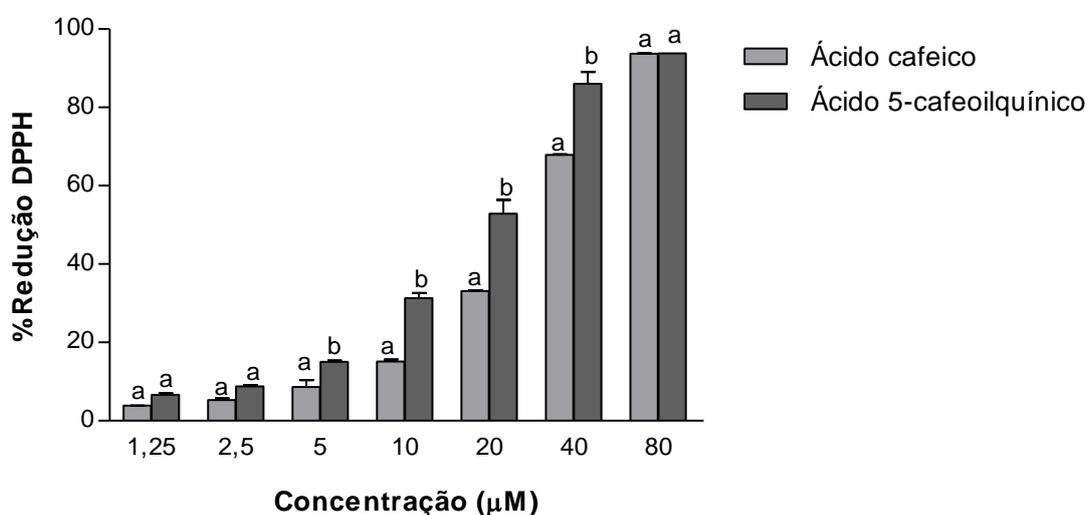


Figura 12. Percentual de redução dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico pelo método DPPH em diferentes concentrações, após 30 minutos de ensaio. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes em uma mesma concentração indicam diferença estatística (Teste-t de Student, $p \leq 0,05$).

Na Tabela 9 está demonstrada a concentração de CA e 5-CQA necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH (IC₅₀).

Tabela 9. Valor do IC50 (μM) dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico.

Compostos	IC50 (μM)
Ácido cafeico	36,5
Ácido 5-cafeoilquínico	16,2

O 5-CQA apresentou menor valor de concentração, cerca de duas vezes menos, para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH. Este, por apresentar menor valor de IC50, pode ser considerado mais efetivo em termos de atividade antioxidante, através deste método.

Ao analisar a atividade antioxidante dos compostos pelos métodos FRAP e ORAC, observou-se que, tanto o CA quanto o 5-CQA apresentaram um aumento significativo da atividade antioxidante com o aumento da concentração dos compostos, corroborando com os resultados observados quando avaliados pelo DPPH. Pelo método FRAP, o 5-CQA demonstrou ter uma atividade antioxidante superior a do CA, sendo que, o inverso foi observado quando a atividade antioxidante foi avaliada pelo método ORAC, ou seja, neste método o CA demonstrou uma atividade antioxidante superior a do 5-CQA (Figuras 13 e 14).

Foi observado, ainda, que a atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, quando avaliadas pelo método ORAC, demonstraram ser significativamente diferente em todos os tempos e concentrações estudadas ($p \leq 0,05$). Porém, pelo método FRAP, a atividade antioxidante dos compostos só foi estatisticamente diferente em concentrações superiores a $5 \mu\text{M}$.

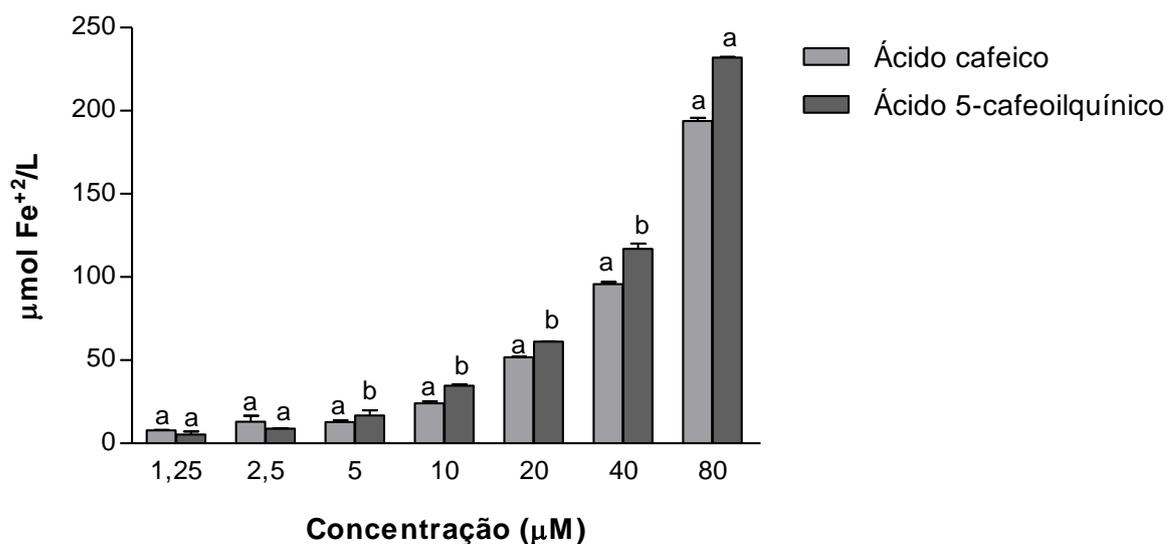


Figura 13. Capacidade de redução do ferro dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em diferentes concentrações. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma concentração indicam diferença estatística (Teste-t de Student, $p \leq 0,05$).

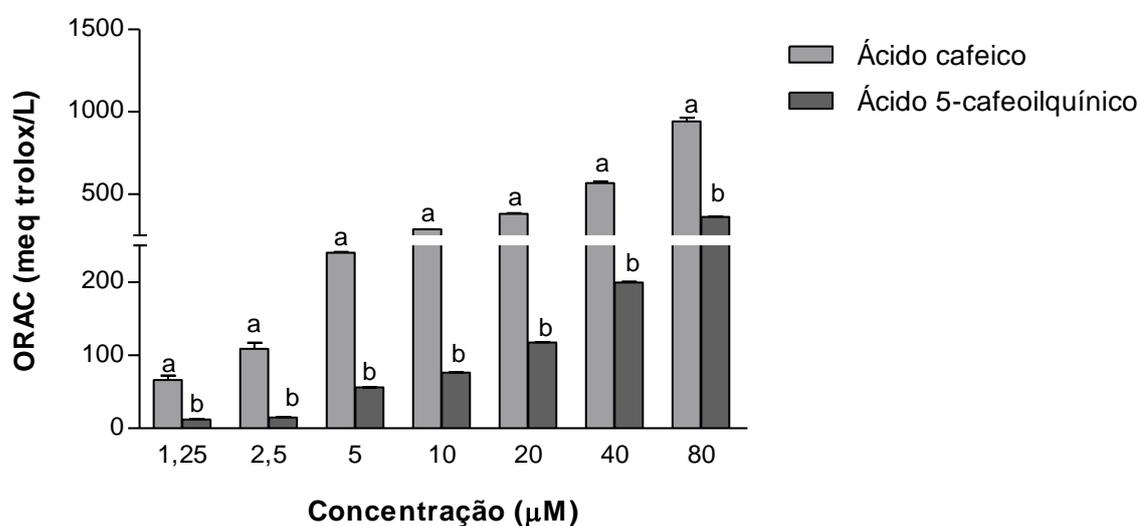


Figura 14. Atividade antioxidante, avaliada pelo método ORAC, dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em diferentes concentrações. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma concentração indicam diferença estatística (Teste-t de Student, $p \leq 0,05$).

A correlação entre os métodos utilizados foi analisada através da correlação de Pearson. Conforme demonstrado na Tabela 10, observou-se uma forte correlação positiva entre a capacidade antioxidante determinada através dos métodos FRAP, ORAC e DPPH para ambos os compostos (CA e 5-CQA).

Tabela 10. Coeficientes de correlação (r) obtidos entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante para os ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA).

Compostos	Variáveis	Coeficiente de correlação de Pearson (r)	Nível de significância
Ácido cafeico	ORAC x FRAP	0,9789	0,0001
	ORAC x DPPH	0,9750	0,0002
	FRAP x DPPH	0,9750	0,0002
Ácido 5-cafeoilquínico	ORAC x FRAP	0,9960	<0,0001
	ORAC x DPPH	0,9353	0,0022
	FRAP x DPPH	0,9202	0,0033

Apesar das diferenças de atividade antioxidante verificada entre o CA e o 5-CQA nos diferentes métodos avaliados, nossos resultados demonstraram que os métodos utilizados possuem forte correlação positiva com a capacidade antioxidante, ratificando, portanto, o que já está descrito na literatura, acerca da elevada atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico.

5.2 CINÉTICA DE CAPTAÇÃO DO CA E 5-CQA PELAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)

As células HT-29 foram incubadas com 5 μ M de CA e 5-CQA, isoladamente, durante 0,5 h; 1 h; 2 h; 6 h; 12 h; 24 h; 48 h; 72 h e 96 h para o estudo da cinética de captação destes compostos. Foram incluídos grupos controle em todos os tempos, sendo os mesmos tratados somente com meio próprio (isento do composto). Não foi observada a presença de compostos fenólicos nos grupos controles (dados não mostrados).

5.2.1 Incubação com o ácido 5-cafeoilquínico

Cinco compostos fenólicos foram identificados e quantificados no lisado celular após a incubação com 5 μ M de 5-CQA. Eles incluíram os ácidos 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 5-cafeoilquínico (5-CQA), cafeico (CA) e isoferúlico (IsoFA) (Figura 15). Contudo, no meio de cultura somente três compostos fenólicos foram identificados e quantificados (3-, 4- e 5-CQA) (Figura 16).

Um aumento significativo na captação celular de 5-CQA foi observado 0,5 h, 1 h e 2 h após a incubação, com captação máxima (46,04 μ g/g ptn) 2 h após a incubação (Figura 15). Nesses mesmos tempos, baixas concentrações de 5-CQA foram identificadas no meio de cultura (Figura 16), indicando que o 5-CQA foi rapidamente captado pelas células intestinais. Seis horas após a incubação, foi observada uma redução na captação celular de 5-CQA, sendo esta acompanhada por um aumento no conteúdo de 5-CQA no meio de cultura (Figuras 15 e 16). Foi observado que ocorreu a isomerização do 5-CQA no meio celular, com formação de 3-CQA e 4-CQA, 0,5 h após a incubação com 5-CQA (Figura 15). A presença de 3-CQA no interior da célula foi observada a partir de 0,5 h após a incubação com 5-CQA e o mesmo esteve presente no interior da célula até o tempo de 96 h após a incubação (Figura 15). Com relação ao 4-CQA, um aumento no conteúdo intracelular foi observado apenas em 2 momentos, 2 h e 72 h após a incubação com 5-CQA (Figura 15). A captação máxima de 3-CQA (8,5 μ g/g ptn) e 4-CQA (7,6 μ g/g ptn) ocorreu 2 h após a incubação (Figura 15).

O ácido isoferúlico (IsoFA) foi identificado no lisado celular 6 h, 12 h e 24 h após a incubação com o 5-CQA, sendo a concentração máxima (2,02 µg/g ptn) observada no tempo de 6 h (Figura 15). Setenta e duas e noventa e seis horas após a incubação foi observado um aumento significativo na concentração intracelular de ácido cafeico (Figura 15).

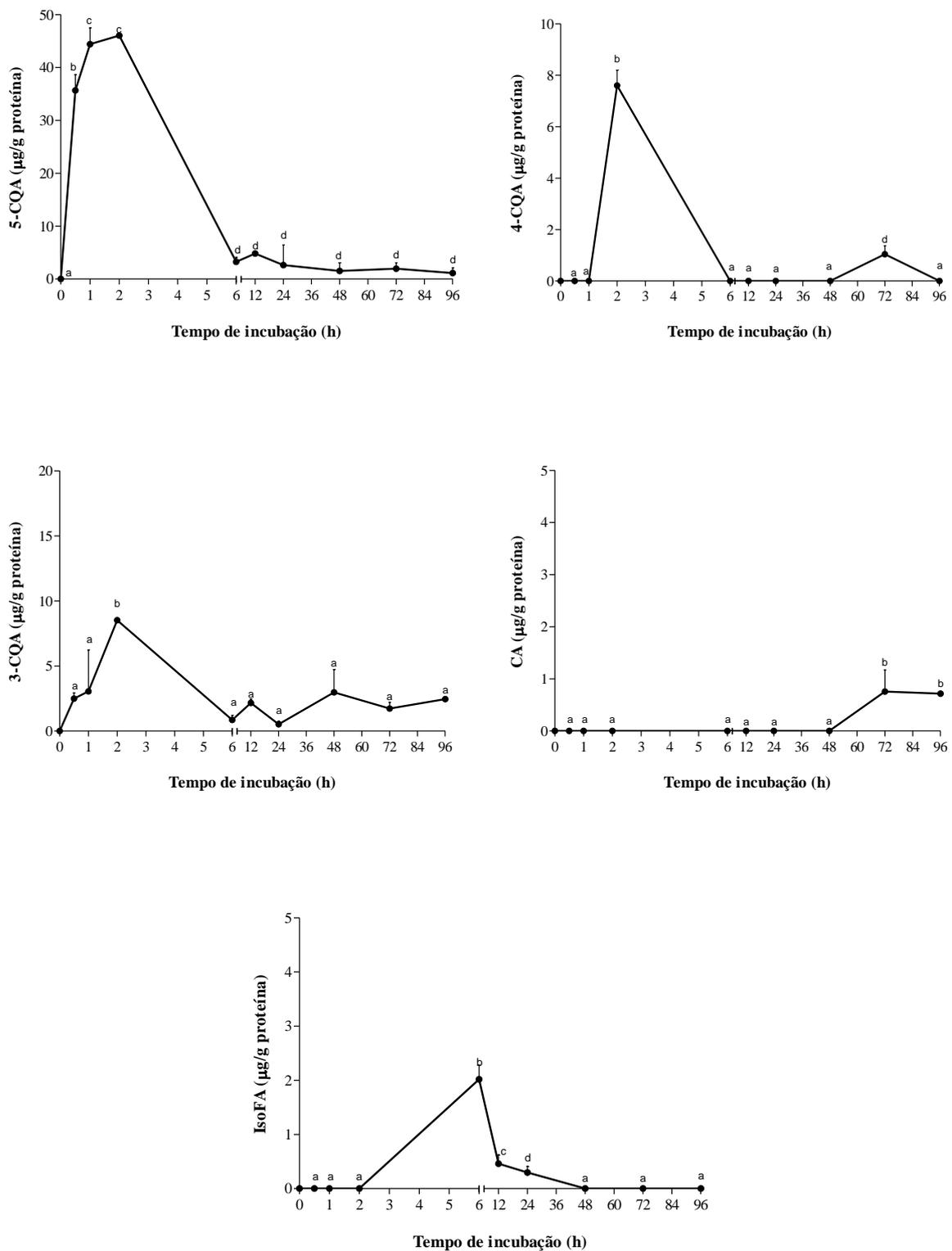


Figura 15. Concentração (μg/g proteína) dos ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 3-cafeoilquínico (3-CQA), cafeico (CA) e isoferúlico (IsoFA) no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 5 μM de 5-CQA (0,5 h a 96 h). Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três experimentos. Letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

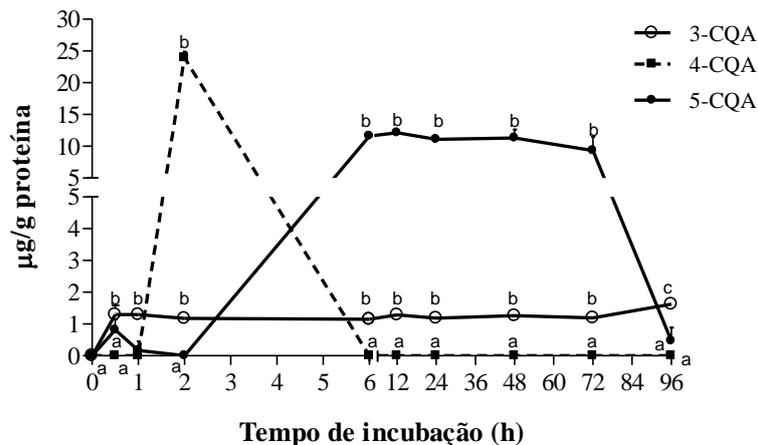


Figura 16. Concentração ($\mu\text{g/g}$ proteína) de 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA) no meio de cultura após a incubação com $5 \mu\text{M}$ de 5-CQA (0,5 h a 96 h). Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão de três experimentos. Letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

5.2.2 Incubação com o ácido cafeico

Três compostos fenólicos foram identificados e quantificados nas amostras de células após incubação com $5 \mu\text{M}$ de CA. Eles incluíram os ácidos cafeico (CA), dihidrocafeico (DHCA) e 2,4-dihidroxibenzoico (Figura 17). No meio de cultura nenhum composto fenólico foi identificado (dados não mostrados).

Um aumento significativo na captação celular de CA foi observado 0,5 h, 1 h e 2 h após a incubação, com captação máxima ($3,92 \mu\text{g/g ptn}$) 2 h após a incubação (Figura 17). Após este período foi observado um decréscimo na concentração celular de CA, sendo detectado, contudo, um aumento na concentração intracelular de DHCA, com captação máxima ($26,94 \mu\text{g/g ptn}$) 6 h após a incubação com CA (Figura 17). Seis horas após a incubação com CA foi possível detectar também a presença do ácido 2,4-dihidroxibenzoico, o qual apresentou captação máxima 24 h e 72 h após a incubação (Figura 17).

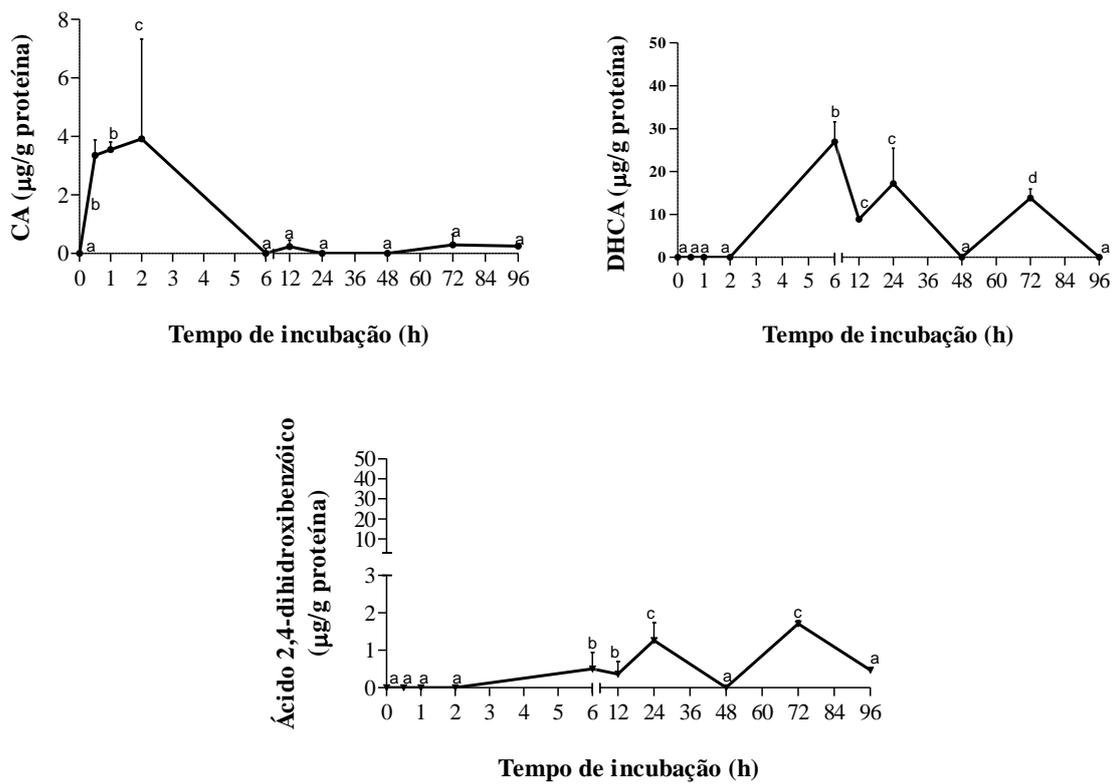


Figura 17. Concentração (μg/g proteína) dos ácidos cafeico (CA), dihidrocafeico (DHCA) e 2,4-dihidroxi benzóico no conteúdo intracelular de células HT-29 após a incubação com 5 μM de CA (0,5 h a 96 h). Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de três experimentos. Letras diferentes indicam diferença estatística (One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Um perfil cromatográfico do lisado celular encontra-se exposto na Figura 18.

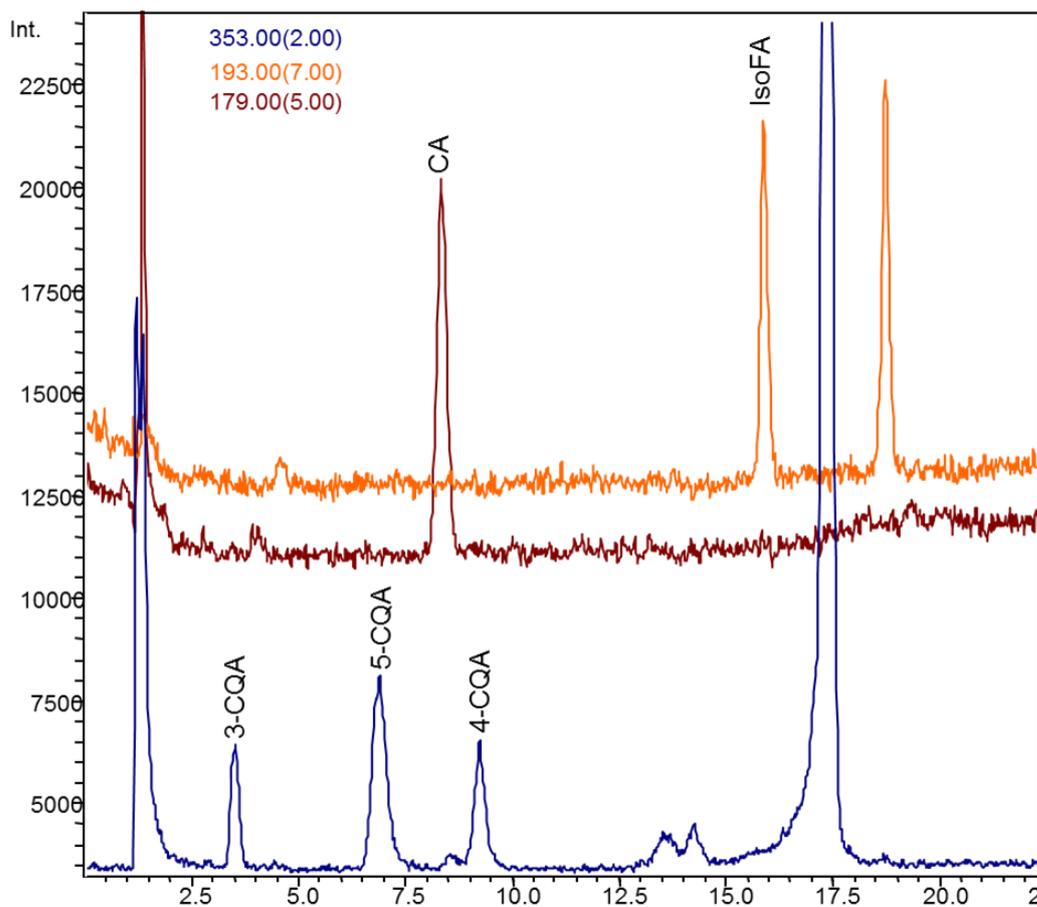


Figura 18. Cromatograma seletivo de íons do lisado celular obtido após análise por CLAE-EM.

As tabelas, contendo os valores absolutos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico no lisado celular e no meio de cultura, após incubação com 5 μ M de CA e 5-CQA, isoladamente, bem como, dos compostos identificados encontram-se em anexo (ANEXOS A e B).

Os resultados encontrados em nosso estudo demonstram, portanto, que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelas células intestinas, gerando, compostos intermediários e metabólitos.

5.3 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Para análise de viabilidade celular, as células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram incubadas com concentrações de 1,25 μM a 80 μM de CA e 5-CQA isolados e, analisadas nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o início da incubação.

O ensaio de MTT foi utilizado para monitorar a viabilidade celular. Na linhagem celular HT-29, foi possível observar que, inicialmente, o 5-CQA não modificou o perfil de células viáveis, quando comparado ao controle, até as primeiras 72 horas de incubação (Figuras 19A, 19B e 19C). Entretanto, 96 h após a incubação com o 5-CQA, constatou-se uma redução significativa no percentual destas células, quando comparado ao grupo controle (Figura 19D). O 5-CQA promoveu uma inibição média de 26% para este tipo celular, nas concentrações iguais ou maiores que 2,5 μM , não havendo, contudo, diferença significativa entre as concentrações utilizadas.

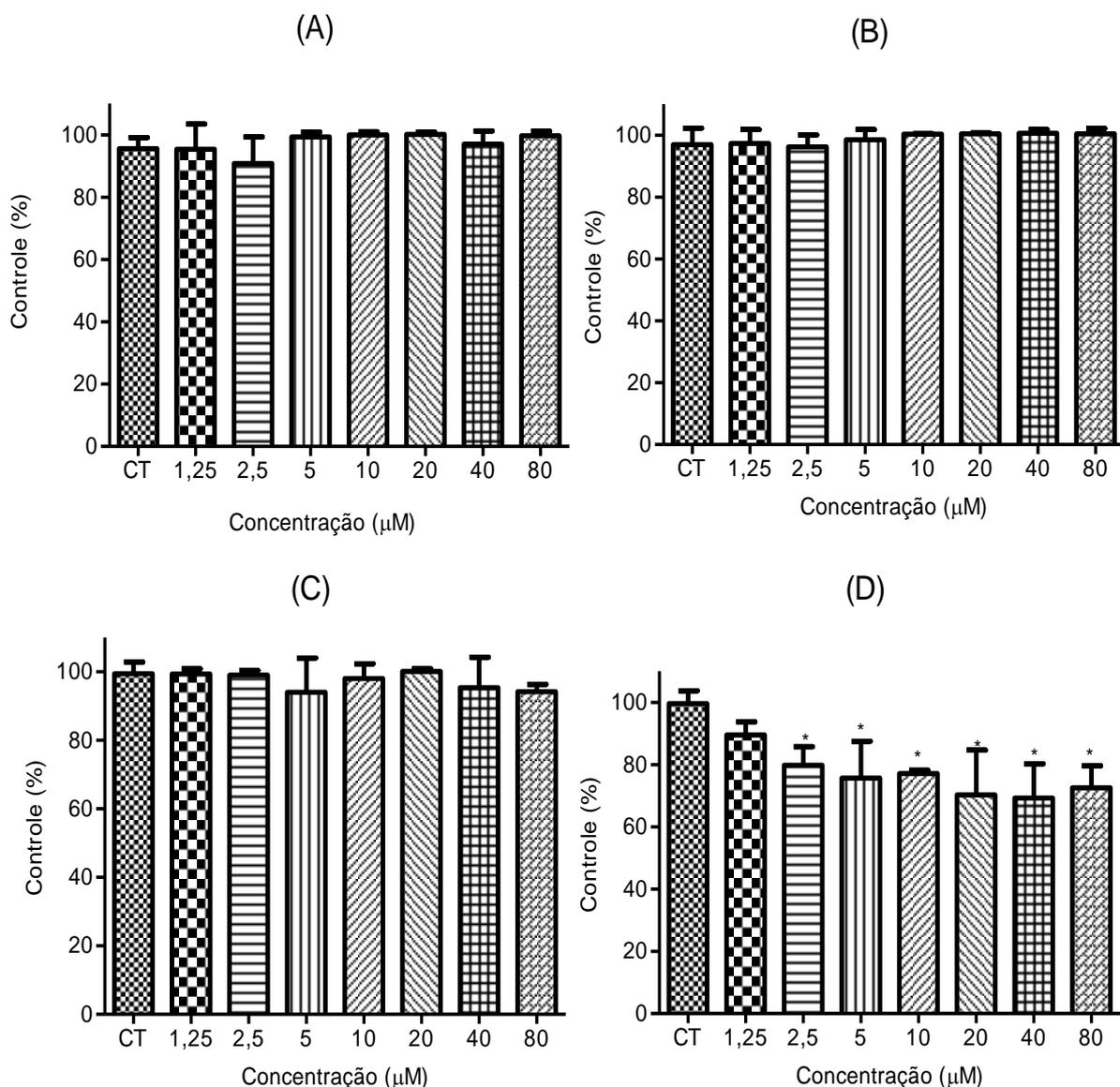


Figura 19. Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a viabilidade de células HT-29 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D) após a incubação. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as incubadas com o 5-CQA (1,25 μ M a 80 μ M) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* p < 0,05; ** p < 0,01).

Quando as células da linhagem HT-29 foram incubadas com o CA, observou-se que, 24 h após a incubação, o composto em questão já modificou o perfil de crescimento das células viáveis quando comparado ao controle (Figura 20A). Vinte e quatro horas após a incubação com o CA foi observada uma inibição média de 26% nas concentrações iguais ou maiores que 20 μ M. Da mesma forma, 48 h após a incubação, o CA foi capaz de reduzir, em torno de 25,7%, o percentual de células viáveis, para as células incubadas com concentrações de 1,25 μ M a 20 μ M (Figura

20B). Este efeito foi ainda mais pronunciado quando as células foram incubadas com concentrações iguais ou maiores que 40 μM , apresentando, aproximadamente, 41% de redução na viabilidade celular da linhagem HT-29, quando comparada ao controle. Além disso, foi observada diferença significativa na redução celular entre as maiores concentrações (40 μM e 80 μM) e as concentrações inferiores (1,25 μM a 20 μM).

Setenta e duas horas após a incubação com o CA nas concentrações de 1,25 μM , 2,5 μM e 5 μM foi observada uma redução significativa no número de células, que variou de 16 a 29% (média de 22,5%), quando comparado ao grupo controle, porém, sem diferença significativa entre estas concentrações (Figura 20C). Uma redução mais acentuada e significativa, em torno de 59,8%, foi observada quando as células foram incubadas com concentrações maiores ou iguais a 10 μM do CA (Figura 20C).

Para as células incubadas com o CA por 96 horas, foi observado uma redução significativa do percentual de células viáveis, com média de 57,5%, quando as células foram incubadas nas concentrações de 1,25 μM a 80 μM , não havendo, contudo, diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Figura 20D).

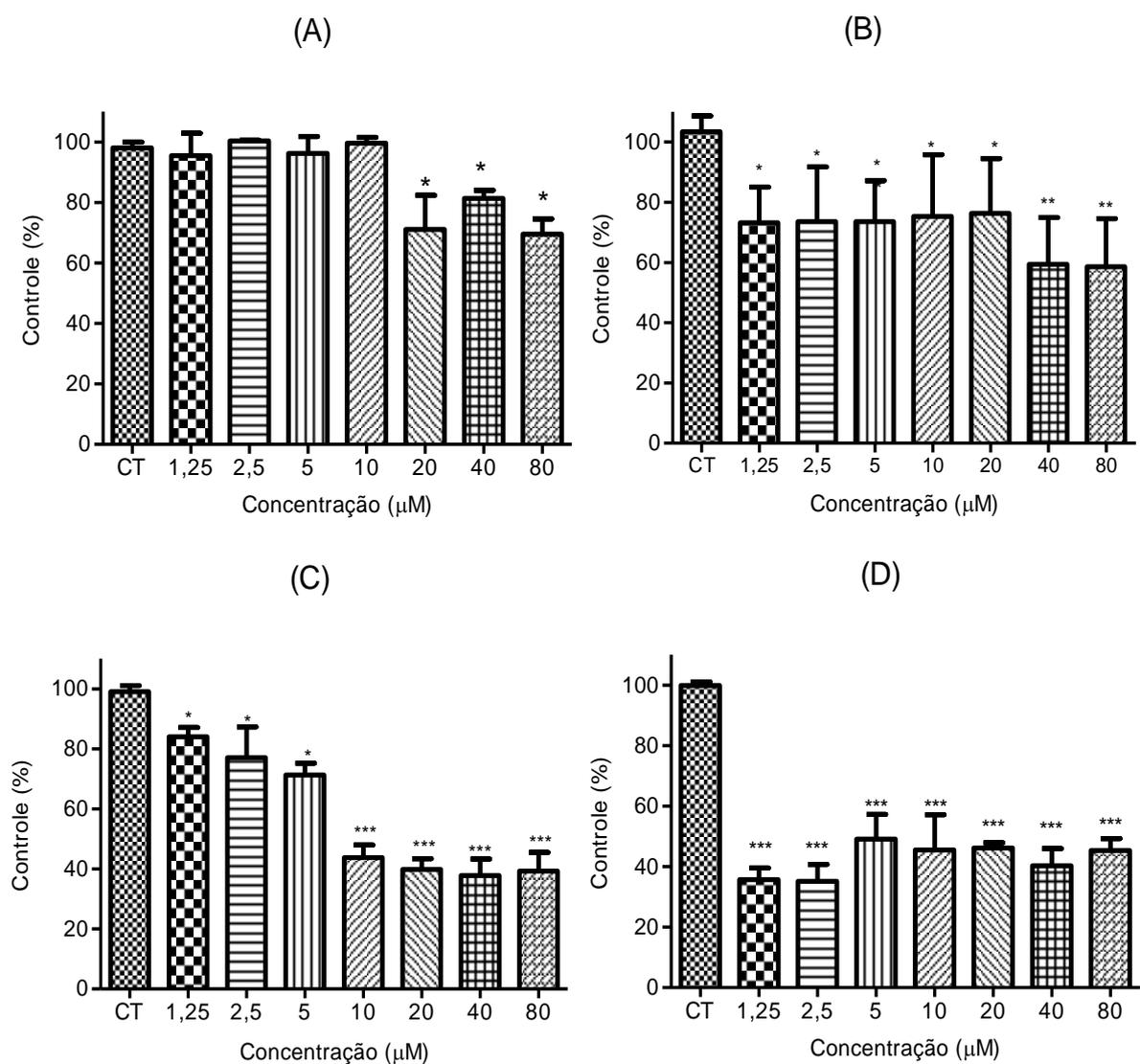


Figura 20. Efeito do ácido cafeico sobre a viabilidade de células HT-29 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D) após a incubação. Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as incubadas com o CA (1,25 μ M a 80 μ M) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós- teste de Tukey (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

5.4 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

Com a finalidade de monitorar a influência do CA e 5-CQA sobre o ciclo celular, as células em estudo foram incubadas com concentrações de 5 μM e 10 μM de cada composto, isoladamente, em intervalos de tempo de 48 h e 96 h e, posteriormente, quantificadas quanto ao percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Foi observado que a linhagem HT-29 apresentou um aumento no percentual de células na fase G0/G1, seguido por uma diminuição no percentual de células na fase G2/M, quando incubadas com o 5-CQA nas concentrações de 5 μM e 10 μM , em ambos os tempos (Figuras 21 e 22), sendo, em geral, o efeito dose e tempo-dependente. Foi possível observar também uma diminuição no percentual de células presentes na fase S, 48 h após a incubação com 10 μM de 5-CQA e, 96 h após a incubação com 5 μM e 10 μM de 5-CQA.

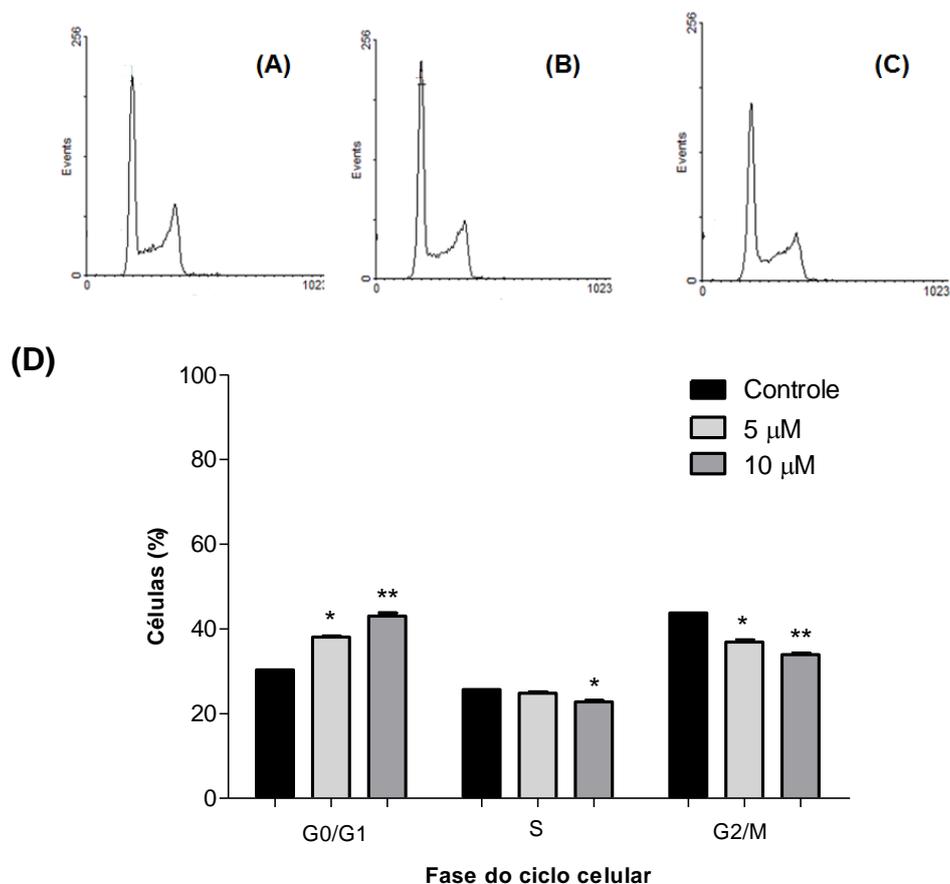


Figura 21. Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 48 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (5 μM) e C (10 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com 5-CQA (5 μM e 10 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

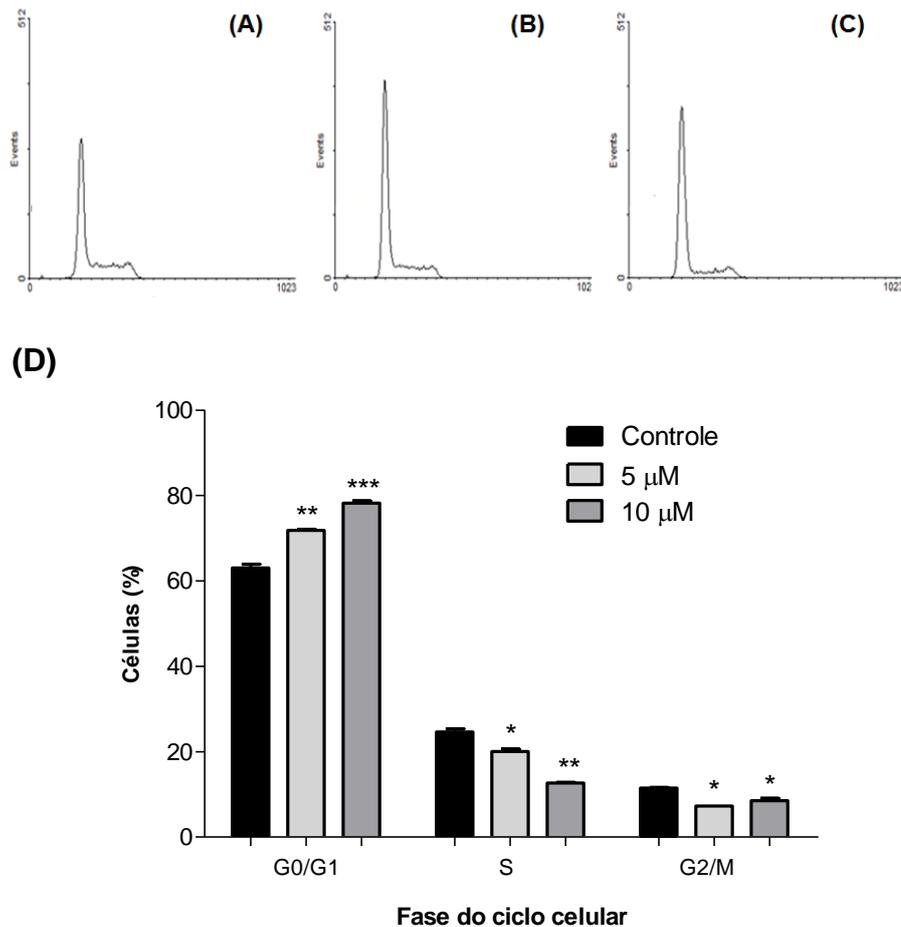


Figura 22. Efeito do ácido 5-cafeoilquínico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 96 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (5 μM) e C (10 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com 5-CQA (5 μM e 10 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Quando as células HT-29 foram incubadas com CA, na concentração de 5 μM por 48 h, observou-se um aumento no percentual de células na fase G0/G1, sem, contudo, ser observado alteração significativa no percentual de células nas fases S e G2/M. As células HT-29 incubadas com 10 μM de CA, durante 48 horas, apresentaram, da mesma forma, um aumento no percentual de células na fase G0/G1, além de uma diminuição no percentual de células viáveis na fase S e G2/M

(Figura 23). 48 h após a incubação com o CA, o efeito nas alterações nas fases do ciclo celular demonstrou ser dose-dependente.

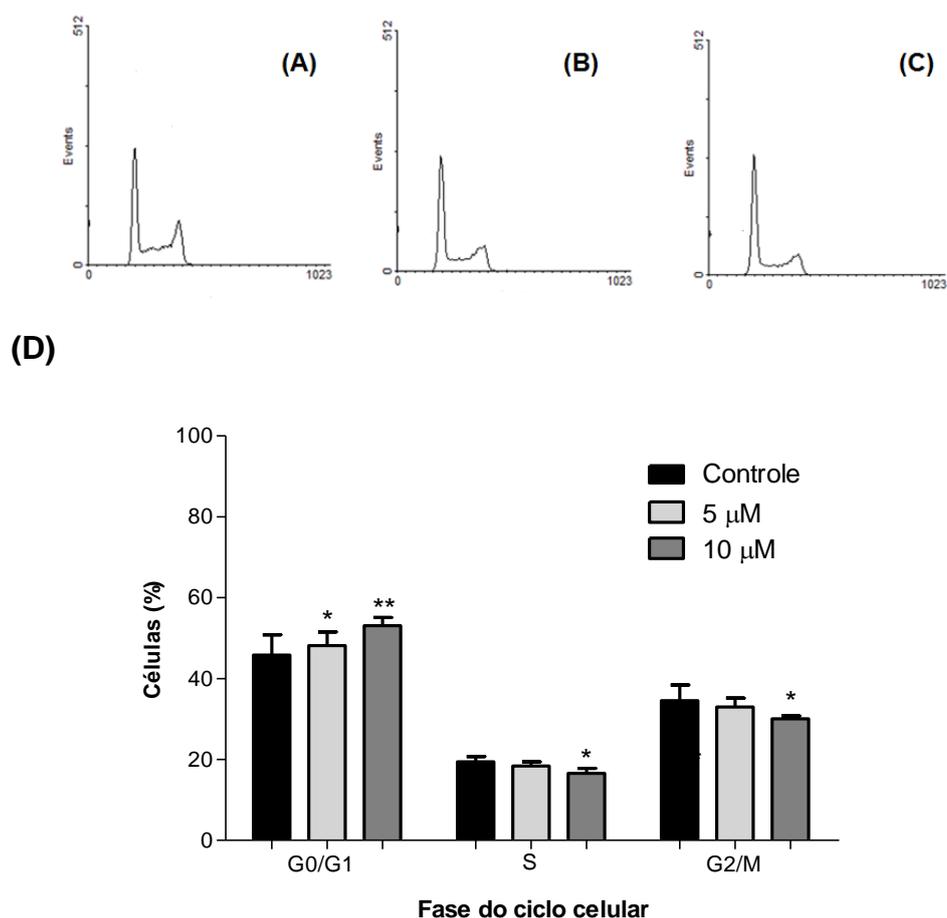


Figura 23. Efeito do ácido cafeico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 48 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (5 μM) e C (10 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com CA (5 μM e 10 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Noventa e seis horas após a incubação com 5 μM e 10 μM de CA também foi observado um aumento no percentual de células na fase G0/G1. O percentual de células na fase G2/M não sofreu alteração significativa 96 h após a incubação com o CA, sendo observada somente uma redução significativa na fase S em ambas as

concentrações (Figuras 24). O CA, por sua vez, não demonstrou, neste ensaio, efeito tempo-dependente.

Estes resultados são indicativos de que tanto o 5-CQA quanto o CA foram capazes de modular o ciclo celular, via inibição da progressão do mesmo.

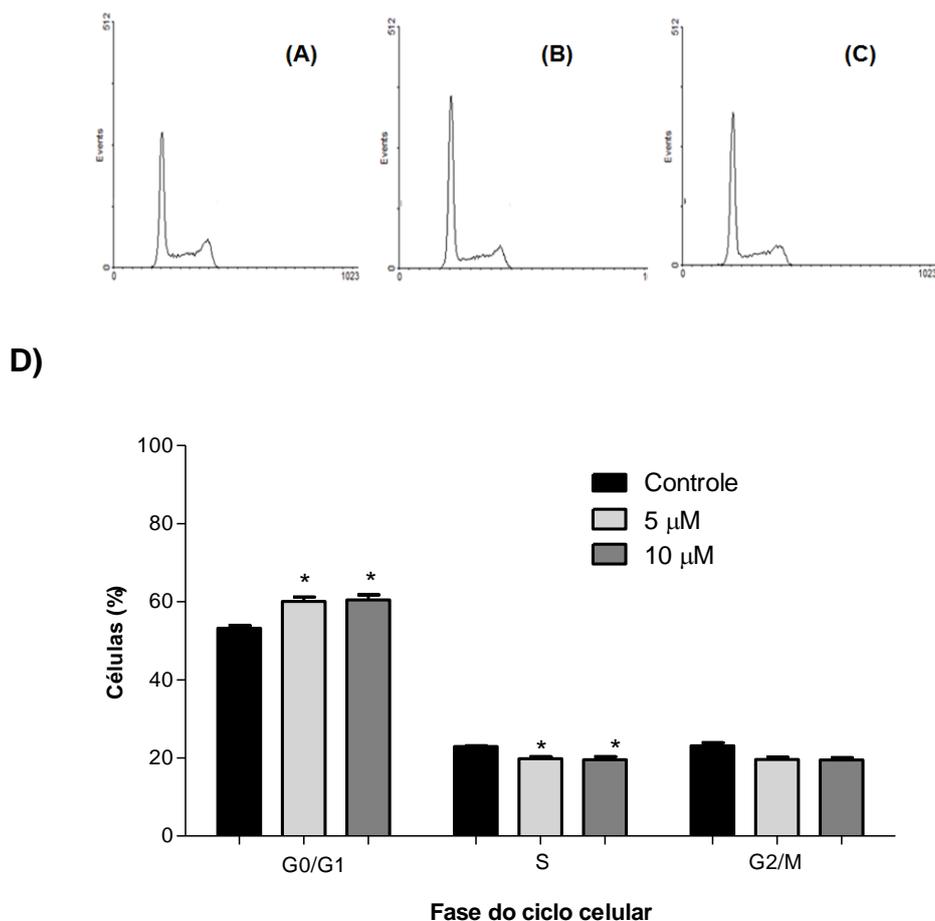


Figura 24. Efeito do ácido cafeico sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 96 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (5 μM) e C (10 μM). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com CA (5 μM e 10 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.5 EFEITO DO CA E 5-CQA SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29)

A quantificação do número de células mortas em processo apoptótico pode ser uma medida útil para avaliar os efeitos citotóxicos às células cancerosas. A alteração do equilíbrio entre proliferação celular e morte por apoptose tem sido associado à tumorigênese. Neste ensaio, as células em estudo foram incubadas com CA e 5-CQA isolados (5 μ M e 10 μ M) durante 48 h e 96 h.

Quarenta e oito horas após a incubação com 5-CQA, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no percentual de células viáveis, bem como um aumento significativo ($p < 0,01$) do percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia), quando comparadas as células não tratadas (controle). O percentual de células não-apotóticas não sofreu alteração significativa após incubação com 5-CQA em ambas as concentrações e tempos ($p > 0,05$) (Tabelas 11 e 12).

Ao ser incubada com 5 μ M de CA, a linhagem celular HT-29 apresentou, 48 h após a incubação, uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no percentual de células viáveis, bem como, um aumento no percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia), quando comparadas as células não tratadas (controle) (Tabela 11). Contudo, quarenta e oito horas após a incubação com 10 μ M de CA, só foi observado um aumento no percentual de células em apoptose inicial. O percentual de células viáveis e o percentual de células em apoptose tardia não sofreu alteração significativa neste tempo e concentração quando comparados ao controle (Tabela 11).

Noventa e seis horas após a incubação com 5 μ M de CA não foi observado alteração no percentual de células viáveis e no percentual de células em apoptose ($p > 0,05$) quando comparadas as células não tratadas (controle). Todavia, 96 h após incubação com 10 μ M de CA, foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no percentual de células viáveis e, um aumento significativo ($p < 0,01$) no percentual de células em apoptose (apoptose inicial e tardia) quando comparadas as células não tratadas (controle) (Tabela 12).

O percentual de células não-apoptóticas não sofreu alteração significativa após incubação com CA em ambas as concentrações e tempos ($p > 0,05$) (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Efeito dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico (5 μM e 10 μM) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 48 h após a incubação.

Composto	Fases do processo de morte celular	CT	5 μM	10 μM
5-CQA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	77,25 \pm 1,34	67,75 \pm 1,06**	64,15 \pm 0,78**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	11,35 \pm 0,78	19,5 \pm 1,13**	14,6 \pm 0,99
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	5,5 \pm 0,57	8,55 \pm 1,77	17,4 \pm 1,98**
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	5,9 \pm 1,13	4,2 \pm 0,42	3,85 \pm 0,21
CA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	81,6 \pm 1,13	53,15 \pm 3,61**	74,65 \pm 2,47
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	5,65 \pm 0,78	16,9 \pm 1,13**	13,0 \pm 0,85**
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	6,3 \pm 0,85	19,05 \pm 0,92**	7,75 \pm 2,47
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	6,45 \pm 1,06	10,9 \pm 1,56	4,6 \pm 0,85

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos e representam o percentual do total de células. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com os ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA) e cafeico (CA), nas concentrações de 5 μM e 10 μM , foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tabela 12. Efeito dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico (5 μM e 10 μM) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 96 h após a incubação.

Composto	Fases do processo de morte celular	CT	5 μM	10 μM
5-CQA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	81,1 \pm 0,57	66,7 \pm 1,13**	62,95 \pm 1,91**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	6,95 \pm 1,2	12,7 \pm 1,13*	14,95 \pm 1,20*
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	9,0 \pm 0,42	17,3 \pm 0,57**	17,1 \pm 1,13**
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	2,95 \pm 1,34	3,3 \pm 0,57	5,0 \pm 0,42
CA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	70,15 \pm 1,91	72,7 \pm 2,69	50,1 \pm 1,7**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	13,75 \pm 1,91	16,6 \pm 0,99	30,0 \pm 1,27**
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	9,45 \pm 2,05	7,6 \pm 0,85	17,05 \pm 1,06*
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	6,65 \pm 1,77	3,1 \pm 0,85	2,85 \pm 0,64

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos e representam o percentual do total de células. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com os ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA) e cafeico (CA), nas concentrações de 5 μM e 10 μM , foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

As células HT-29 incubadas com 5 μM e 10 μM de 5-CQA por 48 h apresentaram um incremento máximo na taxa de apoptose, comparado ao controle, de 1,6 e 1,8 vezes, respectivamente, sem, contudo, ser observada diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Figura 25).

Após serem incubadas com o CA por 48 h, em ambas as concentrações (5 μM e 10 μM), a linhagem celular HT-29 apresentou, da mesma forma, um aumento máximo no percentual de células apoptóticas, comparada ao grupo controle, de 1,7 e 3,0 vezes, respectivamente, com diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Figura 25).

Quando as células foram incubadas com 5-CQA (5 μ M e 10 μ M), durante 96 h, foi possível observar um incremento bastante significativo ($p < 0,01$), comparado ao controle, de 1,8 e 2,0 vezes, respectivamente, no percentual de células em apoptose, sem, contudo, ser observada diferença significativa entre as duas concentrações. Todavia, 96 h após a incubação com 5 μ M de CA não foi observado aumento significativo na taxa de apoptose das células HT-29 quando comparado ao grupo controle. Somente quando as células HT-29 foram incubadas com 10 μ M de CA durante 96hs, foi observado um incremento na taxa de células em apoptose. Nesta concentração, foi observado um incremento máximo no percentual de células apoptóticas de 2,0 vezes (Figura 25).

Estes dados reforçam os resultados anteriormente descritos relacionados ao ciclo celular.

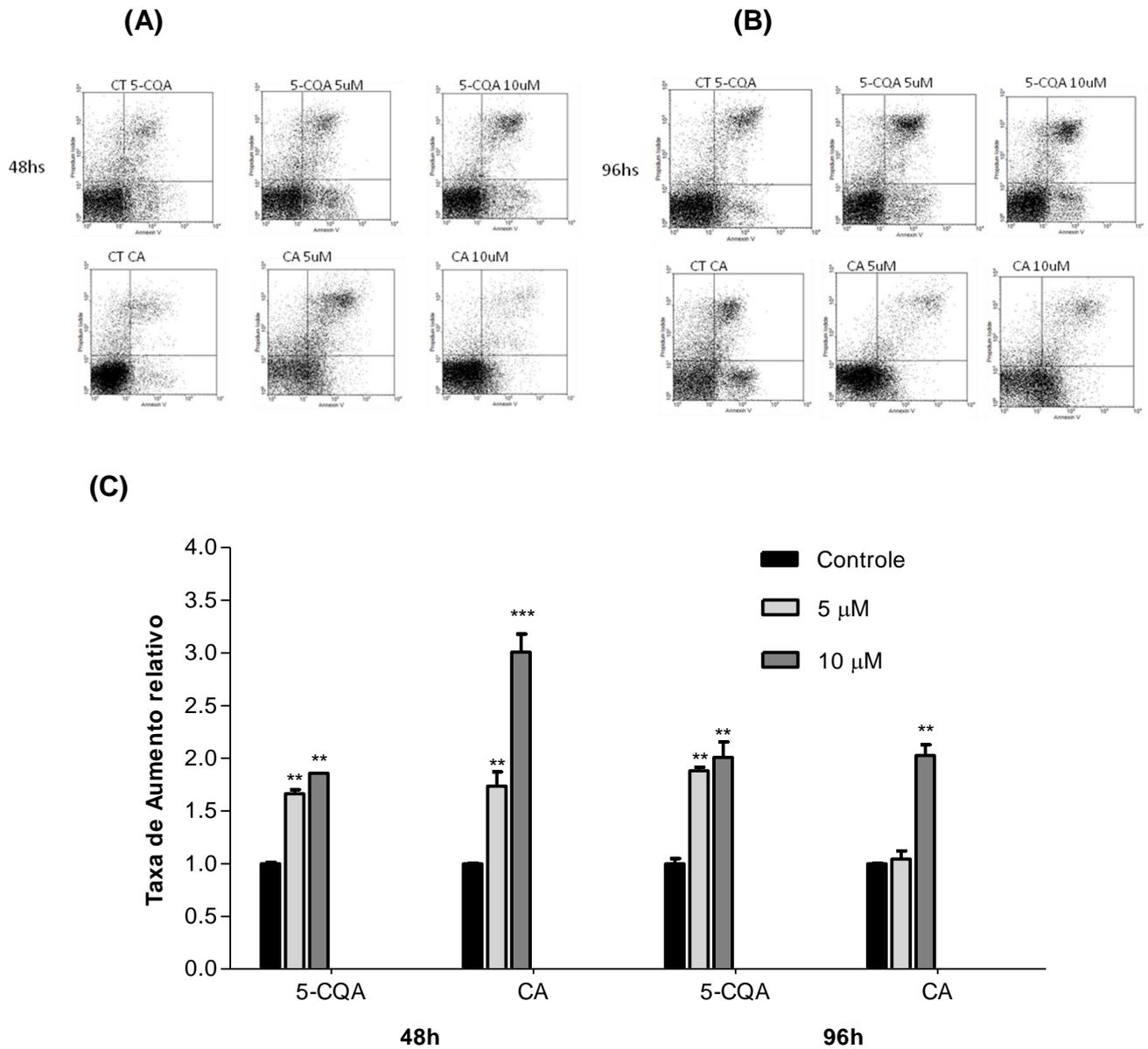


Figura 25. Efeito dos ácidos cafeico (CA) e 5-cafeoilquínico (5-CQA) sobre o processo de morte programada em células HT-29 48 h e 96 h após a incubação. As análises por citometria de fluxo do CA e 5-CQA estão ilustradas em A (48 h) e B (96 h), de acordo com o tempo de incubação e concentração dos compostos. Os resultados quantitativos dos efeitos do CA e 5-CQA sobre células HT-29 48 h e 96 h após a incubação estão ilustrados em C. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com CA e 5-CQA (5 μ M e 10 μ M) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos e ensaios *in vitro* e *in vivo* indicam que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico estão inversamente relacionados com o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (ULLMAN & ITZKOWITZ, 2011). Os resultados do presente trabalho fornecem subsídios que corroboram com os dados descritos na literatura e apontam o papel tanto do CA, quanto do 5-CQA, na prevenção e tratamento do câncer de cólon.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico podem desempenhar importante papel na eliminação de radicais livres, na redução da viabilidade celular, na modulação do ciclo celular e, no controle da progressão tumoral, via indução da apoptose.

Diversos trabalhos na literatura reportam que os ácidos hidroxicinâmicos, entre eles, o 5-CQA e o CA apresentam propriedades antioxidantes (DAAYF & LATTANZIO, 2008; MOREIRA et al., 2005). Maurya & Devasagayam (2010) demonstraram que o CA foi capaz de inibir de forma dependente da concentração os danos oxidativos em linfócitos de ratos causado pelo 2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto (AAPH). De acordo os autores, o CA apresenta atividade antioxidante em diversos sistemas *in vitro*, contra espécies reativas de oxigênio (ERO) e, espécies reativas de nitrogênio (ERN).

Adicionalmente, Nakatani et al. (2000) demonstraram que os isômeros dos CGA, 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA, presentes na ameixa seca apresentaram contribuição para atividade antioxidante, tal como, eliminação dos radicais superóxido.

Apesar destes dados, existe uma grande dificuldade de comparação entre dados experimentais referentes à avaliação da atividade antioxidante, aferida por diferentes métodos, bem como de comparar dados da literatura, haja vista que as metodologias para análise da determinação da atividade antioxidante baseiam-se em diferentes fundamentos. Soma-se a isto, ainda, a complexidade das reações envolvidas na atividade antioxidante. Portanto, é recomendada a utilização de dois ou mais métodos, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a atividade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2003).

Neste trabalho, a atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico foram analisadas por três diferentes métodos (DPPH, FRAP e ORAC). Para os três métodos utilizados foram observados uma elevada atividade antioxidante de ambos compostos. Foi possível ainda observar, em todos os métodos utilizados, um aumento na atividade antioxidante com o aumento da concentração dos compostos testados (1,25 μM a 80 μM). Gülçin (2006) ao avaliar a atividade antioxidante do CA por diferentes métodos, também observou que a capacidade de sequestrar radicais livres aumentou à medida que havia um aumento da concentração do composto.

Foi observado, em nosso trabalho, que pelo método DPPH, o 5-CQA demonstrou possuir uma atividade antioxidante superior a do CA. A concentração de 5-CQA e CA necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH (IC50) foi de 16,2 μM e 36,5 μM , respectivamente. Por apresentar menor valor de IC50, o 5-CQA pode ser considerado, através deste método, mais efetivo em termos de atividade antioxidante, uma vez que é necessária uma menor concentração para redução de 50% do radical DPPH.

Os resultados encontrados no presente trabalho coincidem com os resultados demonstrados por Viturro et al. (1999). Ao analisar o percentual de descoloração do DPPH em plantas e compostos, Viturro, et al. (1999) observaram que tanto os ácidos clorogênicos quanto o ácido cafeico apresentam elevado percentual de descoloração do DPPH e, portanto, potencial atividade antioxidante.

Adicionalmente, estudo conduzido por Lopez-Galilea et al. (2008) com intuito de investigar a aplicação de diversos métodos analíticos sobre atividade antioxidante em amostras de café torrado, demonstraram valores significativos para os parâmetros de capacidade antioxidante entre os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, avaliados pelo método DPPH.

A avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP demonstrou, da mesma forma que pelo método DPPH, que o 5-CQA possui uma atividade antioxidante superior a do CA. Conforme também citado por Martins et al. (2009), apesar das diferenças, os métodos antioxidantes FRAP e DPPH demonstraram resultados similares, exibindo elevada atividade antioxidante, ao avaliar a atividade antioxidante de extratos contendo compostos fenólicos.

Contudo, ao avaliarmos a atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico pelo método ORAC, o inverso foi observado, ou seja, o CA

apresentou atividade antioxidante superior ao 5-CQA. Esses resultados condizem com o descrito por Dávalos et al. (2004). Os autores em questão, ao mensurarem a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos isolados, pelo método ORAC, demonstraram que o CA foi mais efetivo do que o ácido ferúlico e que o ácido clorogênico apresentou redução da atividade.

As diferenças observadas em relação à atividade antioxidante dos compostos e os diferentes métodos utilizados podem ser atribuídas à estrutura química de cada composto, além das características/especificidades de cada método (DÁVALOS et al., 2004). Conforme descrito na literatura, a eficiência dos compostos fenólicos na atividade antioxidante é diversa e um dos fatores relevantes para atividade antioxidante é a estrutura química de cada composto, especialmente o número e o posicionamento de grupamentos hidroxila ligados ao anel aromático (JARDINI et al., 2010).

Apesar das diferenças nas atividades antioxidantes verificadas para um mesmo composto ao ser analisado por diferentes métodos, os métodos para avaliação da atividade antioxidante utilizados (DPPH, FRAP e ORAC) tiveram uma forte correlação positiva entre si, demonstrando, portanto, que estas metodologias podem ser utilizadas de forma adequada para avaliação da capacidade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico. Outros autores já haviam relatado a correlação positiva entre os diferentes métodos para determinação da capacidade antioxidante (SUCUPIRA et al., 2012).

Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação dos compostos, é possível concluir que dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de um composto, alimento ou fluido biológico.

Nossos dados confirmaram o que já é descrito na literatura em relação à elevada atividade antioxidante dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico. Os métodos utilizados em nosso estudo para avaliar a atividade antioxidante destes compostos mostraram-se satisfatórios e adequados.

No que se refere ao metabolismo dos ácidos hidroxicinâmicos, sabe-se que pouca ou nenhuma modificação ocorre durante a mastigação e que os mesmos não sofrem hidrólise pelo suco gástrico (FARAH, 2004; LAMBERT et al., 1999; RECNHER et al., 2001). Portanto, durante o processo de digestão, eles seguem

íntegros até o intestino delgado, onde parecem ser conjugados, absorvidos e/ou metabolizados (DUARTE & FARAH, 2011; MARQUES & FARAH, 2010; MONTEIRO et al., 2010a; FARAH, 2004). Os compostos não absorvidos pelo intestino delgado parecem seguir até o intestino grosso, onde sofrem a ação de bactérias intestinais, principalmente esterases, que são capazes de hidrolisar os CGA, produzindo os ácidos cafeico, ferúlico e outros metabólitos no intestino grosso, que seriam então absorvidos nessa porção do organismo humano.

De fato, alguns autores já comprovaram a biodisponibilidade dos ácidos hidroxicinâmicos e demonstraram que os mesmos são intensamente metabolizados no organismo humano (ERK et al., 2013; STALMACH et al., 2010; RENOUF et al., 2010; FARAH et al., 2008; MONTEIRO et al., 2007). Concentrações plasmáticas médias de 15 μM de CGA, 6 μM de 5-CQA e 2 μM de CA são passíveis de serem encontradas em humanos (FARAH et al., 2008; MONTEIRO et al., 2007).

Em relação à captação intestinal destes compostos, estudos já demonstraram que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelas células intestinais. Konishi & Kobayashi (2004), utilizando cultura de células intestinais Caco-2, demonstraram que ambos compostos são absorvidos e metabolizados por essas células. Contudo, dados sobre a absorção e metabolização destes compostos por células de câncer de cólon, principalmente da linhagem HT-29, ainda são escassos. A ausência de dados acerca da captação dos ácidos cafeico e 5-CQA em diferentes tempos de incubação e com concentrações semelhantes às encontradas na corrente sanguínea por células HT-29 justificaram a escolha dos tempos de incubações, das concentrações dos compostos e da linhagem celular utilizada no presente trabalho.

Vale ressaltar que estudos prévios utilizando o ácido cafeico, ésteres do ácido cafeico e o ácido 5-cafeoilquínico, em concentrações que variaram de 1,25 μM a 80 μM , não demonstraram efeitos citotóxicos (NG, 2011; MCCANN et al., 2007; WANG et al., 2005; NARDINI et al., 1998; RAO et al., 1992).

Nossos resultados referentes aos ensaios de captação celular demonstraram um aumento da concentração intracelular dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico já nos primeiros 30 minutos após a incubação com os compostos, de forma isolada, confirmando, portanto, a captação dos mesmos pelas células HT-29.

Quando as células HT-29 foram incubadas com os ácidos 5-cafeoilquínico e cafeico (5 μ M), foi observado, um aumento significativo no conteúdo dos mesmos no lisado celular 0,5 h, 1 h e 2 h após a incubação, indicando que esses compostos são absorvidos pelas células HT-29.

A captação máxima do 5-CQA ocorreu 2 h após a sua incubação. As baixas concentrações de 5-CQA encontradas no meio de cultura até 2 h após a incubação demonstra que o 5-CQA foi rapidamente captado pelas células intestinais. A diminuição do conteúdo intracelular de 5-CQA acompanhado pelo aumento da sua concentração no meio de cultura 6 h após a incubação com 5-CQA pode indicar um possível limite de captação pelas células ou até mesmo a excreção desse composto, que havia sido anteriormente captado.

Foi observado que ocorreu a isomerização do 5-CQA no meio extracelular, constatado pela presença de 3-CQA e 4-CQA no mesmo. A presença de 3-CQA e 4-CQA no conteúdo intracelular pode indicar que os mesmos foram captados após a sua formação no meio extracelular ou então que a célula foi capaz de isomerizar o 5-CQA internamente, gerando esses dois compostos. De fato, Erk et al. (2013) ao avaliarem a absorção e a isomerização dos ácidos cafeoilquínicos (CQA) de diferentes matrizes alimentares, em voluntários ileostomizados, demonstraram a inesterificação dos ácidos cafeoilquínicos no organismo humano.

A identificação dos ácidos cafeico (CA) e isoferúlico (IsoFA) no lisado celular associado a ausência desses compostos no meio de cultura após a incubação com 5-CQA sugere que a célula foi capaz de hidrolisar o 5-CQA gerando esses dois metabólitos primários. Kern et al. (2003) já haviam demonstrado em cultura de células Caco-2 que essas células são capazes de inserir uma metoxila à estrutura do CA gerando os ácidos ferúlico e isoferúlico. O IsoFA já foi descrito ser um biomarcador da absorção e metabolização dos ácidos clorogênicos no organismo humano (RECHNER et al., 2001).

A presença dos ácidos dihidrocafeico e 2,4-dihidroxibenóico no lisado celular após a incubação com o CA demonstra que as células HT-29 foram capazes de metabolizar o CA. Esses resultados confirmam a hipótese de produção de metabólitos intermediários pelas células intestinais. De fato, alguns autores já haviam relatado que o ácido 2,4-dihidroxibenzóico é um dos metabólitos majoritários dos CGA no organismo humano (MONTEIRO, 2010a; MARQUES & FARAH, 2010).

A captação celular do 5-CQA foi cerca de 12 vezes maior quando comparado com a captação celular do CA. Contudo, tem sido reportado na literatura o fluxo transepitelial do 5-CQA é significativamente menor que o fluxo do CA, o que pode ser explicado, em parte, pela via de transporte dos compostos através das membranas celulares, no qual o 5-CQA é absorvido por transporte paracelular, enquanto o CA é absorvido também por transporte ativo mediado por transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT) (KONISHI et al., 2006; KONISHI & KOBAYASHI, 2004).

É possível supor, portanto, que apesar da maior taxa de concentração intracelular dos ácidos clorogênicos (3-, 4- e 5-CQA) nos momentos iniciais, o CA, por ser uma molécula mais simples e, por possuir um maior fluxo transepitelial, quando comparado ao 5-CQA, tenha sido captado de forma mais eficiente. Além disso, a captação celular do CA em período anterior aos 30 minutos não pode ser descartada.

O fato da captação intestinal do 5-CQA ter sido maior do que a do CA não significa que este composto possuirá uma maior atividade metabólica, haja vista que esta é dependente do metabolismo e biodisponibilidade destes compostos no interior da célula, além do fluxo transepitelial e da taxa de permeabilidade dos mesmos ao longo das membranas celulares. Portanto, o CA pode ser capaz de exercer seus efeitos metabólicos previamente corroborando com os resultados de viabilidade celular.

Vale ainda ressaltar que ao analisarmos o meio de cultura das células incubadas com CA, nenhum composto foi verificado neste meio, reforçando a hipótese já descrita na literatura, de uma absorção mais rápida e, mais eficiente para este composto.

Os resultados encontrados em nosso trabalho ao se avaliar a cinética de captação dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico demonstraram que os mesmos são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelas células de adenocarcinoma de cólon HT-29, gerando metabólitos primários e secundários, os quais também podem atuar como antioxidantes e moduladores de vias metabólicas.

A capacidade de um composto em inibir a proliferação de células cancerígenas é muito desejável. Sabe-se que mudanças no processo de

crescimento celular e ciclo celular são um dos traços principais das células cancerígenas.

Em nosso trabalho, o efeito dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi investigado. A inibição da viabilidade celular pelos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico já foi descrita em outros trabalhos. Rao et al. (1992) demonstraram que o CA, na concentração de 2500 μM , foi capaz de inibir em 50% a proliferação de células de câncer de cólon HT-29. Em outro estudo, o ácido cafeico demonstrou ser capaz de inibir a proliferação de células HepG2, de forma dose-dependente, através do bloqueio da expressão de MMP-9 através da inibição da atividade do NF-kB (CHUNG et al., 2004).

Wang et al. (2005), por sua vez, observaram o efeito dose e tempo dependentes do fenil éster do ácido cafeico (CAPE), quando incubados em cultura de células HCT 116. Da mesma forma, Xiang et al. (2006) demonstraram que o CAPE inibiu o crescimento das células HCT 116 e SW480, de forma dose e tempo-dependentes.

Adicionalmente, em estudo desenvolvido com ratos no intuito de avaliar o efeito protetor do ácido clorogênico sobre a carcinogênese induzida no intestino grosso dos ratos, Matsunaga et al. (2002) observaram que o grupo que recebeu dieta enriquecida com o composto em questão apresentou um efeito inibitório no desenvolvimento de focos de criptas aberrantes intestinais, sugerindo, portanto, que o ácido clorogênico possui um potencial efeito quimiopreventivo contra a carcinogênese de cólon em ratos.

Ao avaliar o efeito de ácidos fenólicos no desenvolvimento de câncer de cólon, utilizando diferentes linhagens celulares, dentre elas a HT-29, Ng (2011) demonstrou que o ácido cafeico, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células HT-29 em 38%, quando comparado ao controle. Contudo, o aumento das concentrações (100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de ocasionar somente uma pequena redução na viabilidade. Ao avaliar o efeito do 5-CQA, o autor demonstrou uma redução de somente 10% na viabilidade celular, na concentração mais elevada (800 $\mu\text{g/mL}$). Recentemente, Jaganathan (2012) demonstrou que o CA inibiu em 50% a proliferação das células de câncer de cólon HCT 15, quando estas foram incubadas com 800 μM de CA.

Nossos resultados demonstraram uma redução significativa no percentual de células viáveis quando incubadas tanto com o 5-CQA quanto com o CA, quando comparados ao controle, sendo, contudo, observada diferenças entre os compostos em relação ao tempo de exposição ao mesmo e o percentual de redução de células viáveis.

O 5-CQA promoveu uma redução significativa no percentual de células viáveis, em torno de 26%, nas concentrações iguais ou maiores que 2,5 μM , 96 h após a incubação, não havendo, contudo, diferença significativa entre as concentrações utilizadas.

Quando a linhagem celular foi incubada com o CA, observou-se, contudo, que já nas primeiras 24 h, o CA foi capaz de promover uma redução significativa (em torno de 26%) no percentual de células viáveis, para células incubadas com concentrações iguais ou superiores a 20 μM . Da mesma forma, 48 h após de incubação foi observada uma redução significativa (média de 25,7%) no percentual de células viáveis nas concentrações iguais ou maiores que 1,25 μM , sendo, essa redução mais pronunciada nas concentrações iguais ou maiores que 40 μM (em torno de 41%). Após 72 h e 96 h de incubação com CA foi observada uma redução bastante significativa no percentual de células viáveis, em torno de 59,8%, para as células incubadas com concentrações maiores ou iguais a 10 μM por 72 h e, em torno de 57,5%, para células incubadas com concentrações iguais ou maiores que 1,25 μM de CA por 96 h.

Neste sentido, é possível supor que o ácido cafeico é capaz de exercer seus efeitos metabólicos previamente quando comparado ao 5-CQA. O fato do ácido cafeico só ter sido identificado 72 h e 96 h nas células HT-29 incubadas com 5-CQA e, conforme demonstrado em outros estudos, o mesmo possuir um fluxo transepitelial mais eficiente do que o 5-CQA, pode ser a explicação, em nosso estudo, para as células incubadas com ácido cafeico apresentarem redução de sua viabilidade celular já nas primeiras 24 h, enquanto que as incubadas com 5-CQA só terem sido capazes de reduzir a viabilidade celular mais tardiamente, ou seja, após 96 h.

Os dados existentes na literatura e, os encontrados em nosso estudo sugerem que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico possam desempenhar um papel

de agente inibidor da viabilidade celular e, preventivo na proliferação de células de câncer de cólon humano.

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular e, assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S (BOROJEVIC, et al., 2010). Falhas no processo da regulação do ciclo celular podem levar uma proliferação maior de células cancerosas, enquanto que esforços realizados para corrigir este problema, levam a um retardo no crescimento e indução da morte celular (PALOZZA et al., 2009).

Estudos anteriores relataram que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico induziram a parada do ciclo celular na fase G1, sendo esta acompanhada de uma disfunção no potencial de membrana, ativação da proteína Bax, inibição da proteína Bcl-2 e, conseqüentemente, ativação da proteína p53, dentre outros mecanismos, em células HCT 15 (JAGANATHAN, 2012; LEE et al., 2003).

Xiang et al. (2006) observaram, da mesma maneira, que as células HCT 116 e SW480, após tratadas com fenil éster do ácido cafeico (CAPE), apresentaram um acúmulo de células na fase G0/G1 e, um decréscimo do número de células na fase S, sendo os resultados dose-dependente. Os resultados encontrados por estes autores foram correlacionados a um decréscimo, dose-dependente, na expressão de β -cateninas e, um decréscimo, dose e tempo-dependente, na expressão da ciclina D1 e da proteína c-myc, em ambas as células.

Da mesma forma, Wang et al. (2005) ao avaliarem também o efeito do CAPE sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose na linhagem celular de câncer de cólon humano (HCT 116), em concentrações de 2,5 a 80 mg/L, durante 24 a 96 h, observaram que o CAPE foi associado a uma indução da parada do ciclo celular na fase G0/G1, com indução da apoptose. Hu et al. (2011) observaram que o ácido 3,5-dicafeoilquínico ocasionou um efeito antiproliferativo nas células HT-29, via indução de parada de ciclo celular na fase G0/G1. Estes resultados, segundo o autor, são sugestivos de que o ácido 3,5-dicafeoilquínico possui um potencial efeito terapêutico contra o carcinoma de cólon humano.

Em nosso trabalho, a análise do ciclo celular revelou que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, aumentaram a proporção de células HT-29 na fase G0/G1 e, reduziram o percentual de células presente nas fases S e G2/M, 48 h e 96 h pós-incubação, quando comparadas ao controle, sendo, em geral, o efeito dose-dependente.

Estes dados sugerem uma parada de ciclo celular na fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem. Com a parada do ciclo na fase G0/G1, pressupõe-se que um menor número de células prossiga no ciclo e, alcance as fase S e G2/M, ocasionando, conseqüentemente, a redução no percentual de células observado nesta fase.

Os resultados encontrados na análise do ciclo celular relacionam-se, de forma positiva, aos resultados de viabilidade e captação celular, anteriormente descritos, assim como, aos dados da literatura científica. É possível supor que os compostos intermediários, produzidos através da isomerização e/ou hidrólise do 5-CQA já sejam capazes de atuar de forma positiva na modulação do ciclo celular e, conseqüentemente, na indução da apoptose, nas células incubadas com 5-CQA.

Uma seqüência programada de acontecimentos leva à eliminação de células sem causar danos adjacentes aos tecidos, sendo o processo de apoptose o responsável por manter as células saudáveis, eliminando o excesso ou células anormais. Quando células anormais não conseguem sofrer apoptose, aumenta-se a probabilidade de ocorrer mutações, podendo tornar-se células carcinogênicas. Recentes pesquisas suportam a hipótese do papel central da apoptose na tumorigênese.

A maior resistência a apoptose é uma característica de muitas células tumorais. A deficiência de apoptose, portanto, é considerada como sendo uma causa importante da resistência terapêutica de tumores na prática clínica, uma vez que muitos agentes quimioterápicos e radioterápicos atuam através da indução da apoptose. Estudos anteriores revelaram que os ácidos clorogênicos podem inibir a proliferação de células cancerígenas através da indução do processo de morte celular programada (JAGANATHAN, 2012).

O efeito quimiopreventivo dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, via indução da apoptose, já foi descrito anteriormente em outros trabalhos. Chen et al. (2001) demonstraram o efeito indutor da apoptose do fenil éster do ácido cafeico (CAPE) na

linhagem celular de leucemia mieloide humana (HL-60). As descobertas desses autores indicaram uma indução da apoptose, dose e tempo-dependente, após tratamento com CAPE. Uma concentração de 6 mg/mL de CAPE, durante 6 h e 72 h de tratamento ocasionou uma indução de apoptose de, aproximadamente, 25% e 67%, respectivamente, nas células HL-60. Alterações como mudanças de clivagem da caspase-3, inibição da expressão de Bcl-2 e, estimulação da Bax também foram evidenciadas.

Watabe et al. (2004) demonstraram que o CAPE induziu a apoptose via ativação do sinal Fas em células de câncer de mama MCF-7. Da mesma forma, Tai et al. (2010) ao avaliar a relação entre o consumo de café e algumas condições médicas, como o câncer, demonstraram que o tratamento com o café (fonte significativa de ácidos clorogênicos e ácido cafeico) inibiu a proliferação celular, via efeito indutor da apoptose nas linhagens celulares A2780 e A2780/CP70 (células humanas de câncer de ovário).

Mais recentemente, Puangphant et al. (2011) demonstraram que os ácidos 3,4-, 3,5 e 4,5-dicafeoilquínico foram capazes de inibir a proliferação de células de câncer de cólon (RKO e HT-29) via indução da apoptose, de modo tempo e concentração dependente. Nas células HT-29 foi demonstrado que as frações dos diCQA promoveram um aumento da razão Bax:Bcl-2, além de ativação da caspase-8 e, conseqüentemente, clivagem e ativação da caspase-3.

Adicionalmente, Kang et. al (2011), em seu estudo, utilizando cultura de células tratadas com café descafeinado (0 a 40 μ M) e ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico isolados (0 a 80 μ M), demonstraram que o café e o 5-CQA foram capazes de inibir a formação de metástases pulmonares em células de câncer de cólon (CT-26) através do bloqueio da fosforilação da ERK (proteína quinase responsável pela regulação do sinal extracelular). Ativação da via de sinalização das ERK's está relacionada ao desenvolvimento do câncer de cólon e, os resultados encontrados por este autor demonstraram que tanto o café descafeinado quanto o 5-CQA inibiram a fosforilação das ERK's, inibindo, conseqüentemente, a formação de metástases. Além disto, o estudo em questão demonstrou que consumo de café descafeinado ou 5-CQA atenuou a expressão da COX-2 e das metaloproteinases-2 e -9, as quais encontram-se relacionadas ao processo de invasão celular no câncer.

Da mesma forma, Ng (2011) demonstrou em seu estudo que, em resposta ao tratamento das células HT-29 e HCT 116 com compostos fenólicos, entre eles, o ácido cafeico e o 5-CQA, houve um aumento gradual, dependente da concentração do composto, do marcador de apoptose (Bax) e, uma diminuição dos marcadores inflamatório β -catenina e óxido nítrico sintase (iNOS). O autor menciona, ainda, que o tratamento com 5-CQA reduziu a expressão da ciclina D1 e, aumentou a proteína Bax, em todas as concentrações testadas para este composto.

A maioria destes estudos sugere que a ação apoptótica destes compostos pode depender da inibição da proliferação celular e/ou da modulação da vias de sinalização molecular, a partir do tratamento com os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico. Porém, poucos estudos revelaram o efeito destes compostos em células de adenocarcinoma de cólon, após longo período de tratamento e com doses relativamente baixas.

Em nosso trabalho, os ensaios de apoptose demonstraram que os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, 48 h e 96 h após a incubação, foram capazes de promover morte celular por apoptose, quando comparado ao grupo controle, com exceção do grupo incubado com 5 μ M de ácido cafeico por 96 h.

Neste sentido, os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico mostraram-se potentes agentes antioxidantes, capazes de serem captados e metabolizados pelas células de adenocarcinoma de cólon humano, atuando como inibidores da viabilidade celular e, sugerindo uma modulação do ciclo celular, com aumento do processo de apoptose.

Contudo, estudos relacionados à expressão gênica induzida pelos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico fazem-se necessários, visando elucidar quais vias de sinalização celular estão sendo moduladas mediante a incubação das células HT-29 com estes compostos.

7 CONCLUSÃO

A literatura científica atual sobre os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico ainda é escassa, mas o que se tem relatado até o momento, demonstra de forma bastante conclusiva o papel destes compostos como potentes antioxidantes, podendo ser utilizados na prevenção de diversas doenças, entre estas o câncer.

Este estudo confirmou a capacidade antioxidante destes compostos, bem como, demonstrou que os mesmos são capazes de serem absorvidos e metabolizados pelas células de adenocarcinoma de cólon humano. Os ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico foram capazes de atuar positivamente na redução da viabilidade celular, de promover modificações específicas no ciclo celular, através do aumento do percentual de células nas fases G0/G1 e, diminuição na fase G2/M, além do aumento da taxa de apoptose.

Os dados deste trabalho indicam que o efeito antiproliferativo dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico parece ser influenciado por diversos fatores que incluem concentração do composto, tempo de incubação e captação e metabolismo celular dos mesmos.

Neste sentido, este trabalho abre uma série de perspectivas que incluem a pesquisa e busca, através de novos ensaios *in vitro* e, *in vivo*, da influência dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em outros mecanismos celulares para prevenção do câncer de cólon.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004.4 ed., 1.463 p. il.

ALMEIDA, F. F. N. et al. Colorectal cancer screening. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**. v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

ALMEIDA, A. A. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p. 8738–43, 2006.

ALTERI, R. et al. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. **American Cancer Society**, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal cancer and facts & figures - special edition 2008-2010**. Atlanta, 2008.

ANTONIO, A.G. et al. Species, roasting degree and decaffeination influence the inhibitory effect of coffee on the growth of *Streptococcus mutans*. **Food Chem.**, v.118, p. 182-188, 2010.

ARDEKANI, A.M.; JABBARI, S. Nutrigenomics and Cancer. **Avicena J Med Biotech**, v..1, n.1, p. 9-17, 2009.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - ATCC. Characteristics of HT-29 cell line. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/HTB-38>>. Acesso em: 03 de Janeiro de 2013.

BASNET, P. et al. Four di-*o*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, p.1479–84, 1996.

BELKAID, A. et al. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell Int.**,v.6, p.1-12, 2006.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v.239, n.1, p.70-

76, 1996.

BERNSTEIN, C.N.et.al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. **Cancer.**, v.91, n.4, p.854-862, 2001.

BONITA, J.S. et al. Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal and human studies. **Pharmacol. Res.**, v.55, p.187–198, 2007.

BOROJEVIC, R.. et al. Influência dos carotenóides ma proliferação e ciclo celular de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v.43, p.152-153, 2010.

BOSSCHER, D.; et al. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, n.6, p.5-11, 2009.

BRASH, D.E.; HAVRE, P.A. New careers for antioxidants. **PNAS**, v.99, n.22, p.13969-13971, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2003. 36 p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev.**, v.56, n.11, p.317-33, 1998.

BUTTERWORTH, A.S.; HIGGINS, J.P.; PHAROAH, P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. **Eur J Cancer**, v.42, n.2, p.216-227, 2006.

CARNEIRO, J.D. et al. Câncer Colorretal: Características Clínicas e Anatomopatológicas em Pacientes com Idade Inferior a 40 Anos. **Rev bras Coloproct.**, v.26, n.4, p.430-435, 2006.

CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, p.1155–1163, 2002.

CHANG, W.C. et al. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. **Taiwan J Obstet Gynecol.**, v.49, n.4. p.419-424, 2010.

CHEN, T.R. et al. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.27, p.125-134, 1987.

CHEN, Y.J. et.al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.5615–5619, 2001.

CHIANG, L.C. et al. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral Res.**, v.55, p.53–62, 2002.

CHOUDHURY, R. et al. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. **Free Radic. Biol. Med.**, v.27, p.278-286, 1999.

CHUNG, T.W. et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **FASEB J**, v.18, p. 1670-1681, 2004.

CLIFORD, M.N. **Chlorogenic Acids.Coffee: vol 1 – Chemistry**. Elsevier Science Publishing Co, Inc, NY, USA, 1979.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamtes – nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, Surrey, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamtes – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

CORDEIRO, F. et al. **Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal**. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2001.

CORRAO, G. et al. Coffee, caffeine and the risk of liver cirrhosis. **Ann. Epidemiol.**, v.11, n.7, p. 458-65, 2001.

COUTEAU, D. et al. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. **J. Appl. Microbiol.**, v.90, n.6, p.873-881, 2001.

CUTSEM, E. J. D. V.; OLIVEIRA, J. Colon cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. v. 19, n. 2, p. il20-il30, 2008.

CRUZ, G. M. G. et al. Epidemiology, Diagnosis, Staging and Graduation of Colon Cancer in 490 Patients. **Rev bras Coloproct.**, v.27, n.2, p.139-153, 2007.

DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent advances in Polyphenol Research.**, v.1, Wiley-Blackwell, 2008.

DÄVALOS, A.; CORDOVEÄ, S.C.G; BARTOLOMEÄ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p. 48-54, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**. v. 27, n.4, p. 586-592, 2004.

DINI, L.I.; KOFF, W.J. Perfil do câncer de próstata no hospital de clínicas de Porto Alegre. **Rev Assoc Med Bras.**, , v.52, n.1, p. 28-31, 2006.

DUARTE, G.S., FARAH, A. Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acids' Bioavailability in Humans. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, p.7925-7931, 2011.

ERK, T.; et al. Absorption and isomerization of caffeoylquinic acids from different foods using ileostomist volunteers. **Eur. J. Nutr.**, 2013.

FABRE, E. et al. Cancer of the colon: an update. **Bull Cancer**. v. 4, p. 5-20, 2000.

FARAH, A. “**Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café**”. Tese de Doutorado. Programa de Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.2, p.374–381, 2006.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p. 23-36, 2006.

FARAH, A. et al. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **J. Nutr.**, v.138, n.12, p.2309-2315, 2008.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int. J. Cancer**, v.127, p. 2893–2917, 2010.

FLORES, G.B.; ANDRADE, F.; LIMA, D.R. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.21, p. 1059–1070, 2000.

FOGH, J.; TREMPER, G. **New Human Tumor Cell Lines**. In: J. Fogh (ed.), *Human Tumor Cells In Vitro*, pp. 115-160. New York: Plenum Press, 1975.

FOGH, J. et al. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.59, p. 221-226, 1977.

GARAMBONE, E; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alim. Nutr.**, v.18, n.2, p. 229-235, 2007.

GRANADO-SERRANO, A.B.; et al. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n.5, p. 2020-2027, 2007.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.217, p.213–220, 2006.

HARRIS, D.M.; GO, V. L. Vitamin D and colon carcinogenesis. **J. Nut.**, v.134, n.12, p.3463s-3471s, 2004.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Coffee and health: a review of a recent human research. **Food Science and Nutrition**, Corvallis, v.46, n.2, p.101-123, 2006.

HOWE, G.R. et al. Dietary intake of fiber and decrease risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. **Natl. Cancer Inst.**, v.84, p.1887-96, 1992.

HU, W.; SHEN, T.; WANG, M.H. Cell cycle arrest and apoptosis induced by methyl 3,5-dicaffeoyl quinate in human colon cancer cells: Involvement of the PI3K/Akt and MAP kinase pathways. **Chem Biol Interact.**, v.194, n.1, p.48-57, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Brasil. Rio de Janeiro: 3. ed. Rev., 304p., 1999.

JAGANATHAN, S.K. Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. **The Scientific World Journal**, v.2012, p.1-8, 2012.

JAGANATHAN, S. K.; MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-13, 2009.

JANAKIRAM, N. B.; RAO, C. V. Molecular markers and targets for colorectal cancer prevention. **Acta Pharmacologica Sinica.**, v. 29, n. 1, p. 1-20, 2008.

JANICKE, B. et al. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. **Nutrition and Cancer**, v.63, n.4, p.611-22, 2011.

JARDINI, F. A. et al. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células mdck. **Alim. Nutr.**, v. 21, n. 4, p. 509-517, 2010.

JOHNS, L.E.; HOULSTON, R.S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. **Am J Gastroenterol.**,v.96, n.10, p.2992-3003, 2001.

KANG, N. J. et al. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, p.310–324, 2011.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.44, p.453, 2004.

KASAI, H. et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in rat carcinogenesis model. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, n.5, p. 467-471, 2000.

KERN, S.M. et al. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the *in vitro* model of human small intestinal epithelium Caco-2 cells. **J.Agric. Food. Chem.**, v.51, p. 7884-7891, 2003.

KIM, M.; IWAI, K.; MATSUE, H. Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. fruits and their antiradical properties. **J. Food Composition and Anal.**, v.18, n.8, p.789-802, 2005.

KLATSKY, A. L. et al. Coffee, cirrhosis and transaminase enzymes. **Arch. Intern. Med.**, v.166, p.1190–1195, 2006.

KLEIJN, E. M. H. A.; PUNT, C. J. A. Biological therapy of colorectal cancer. **EJC.**, v. 38, n. 7, p. 1016-1022, 2002.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, M. "Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers." **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 67, n.11, p. 2317-2324, 2003.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. "Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers." **J Agric Food Chem.**, v.52, n.9, p.2518-2526, 2004.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic Acids Are Absorbed from the Rat Stomach with Different Absorption Rates. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.7539, 2006.

KOZUMA, K. et al. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. **Hypertens. Res.**, v.28, p.711–718, 2005.

KURATA, R. et al. Growth Suppression of Human Cancer Cells by Polyphenolics from Sweetpotato (*Ipomoea batatas L.*) Leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.185-190, 2007.

LAFAY, S. et al. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **J. Nutr.**, v.136, p.1192–1197, 2006a.

LAMBERT, N. et al. "Purification of cytosolic beta-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides." **Biochim Biophys Acta**, v.1435, n.1-2, p.110-6, 1999.

LARSSON, S.; WOLK, A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. **Gastroenterology**, v.132, p.1740–1745, 2007.

LEE, Y.J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochem Pharmacol.**, v.66, p.2281-2289, 2003.

LINDSAY, J. et al. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **Am. J. Epidemiol.**, v.156, p. 445–453, 2002.

LOPES-GALILEA, I.; PENA, M.P.; CID, C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. **Eur. Food Res. Technol.**, v.227, p.141-149, 2008.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.727-747, 2004.

MARQUES, V. X.; FARAH, A. Urinary excretion of chlorogenic acids and metabolites in humans after green mate (*I. paraguariensis*) consumption. **The FASEB Journal**, v.24, p.922.1, 2010.

MARTINS, D.M. et al. Antioxidant potential of new pyrazoline derivatives to prevent oxidative damage. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.104, p.107-112, 2009.

MATSUNAGA, K. et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Asian Pacific Journal of Cancer Prev.**, v.3, p.163-166, 2002.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 12, p. 3369-3373, 2010.

MCCANN, M. J. et al. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1224-1230, 2007.

MELO, M.; BRAGA, R. Rastreio do cancro do cólon e do recto. **Rev. Port. Clin. Geral**. v. 19, p. 471-482, 2003.

MONTEIRO, M.C.; FARAH, A. **Caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acids are excreted in both free and bound forms in human digestive fluids**. Em: 22st International Conference on Coffee Science, 2008.

MONTEIRO, M.C.; MARQUES, V.X.; FARAH, A. Chlorogenic acids from green and roasted coffees are equally absorbed and metabolized by humans. **The Faseb Journal**, v.24, p.922.2, 2010a.

MONTEIRO, M. et al. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **J. Nutr.**, v.137, p.2196–2201, 2007.

MOREIRA, D.P. et al. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.1399–1402, 2005.

MORI, H. et al. Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. **Biofactors**, v.12, n.1-4, p.101-105, 2000.

MORISHITA, Y. et al. Regressive effects of various chemopreventive agents on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. **Jpn J Cancer Res**, v. 88, n. 9, p.815-820, 1997.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NAKATANI, N. et al. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.5512-5516, 2000.

NARDINI, M. et al. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, n.9, p.1098–1105, 1998.

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Colorectal Cancer Screening**, 2008. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/colorectal-screening>> Acesso em: 24 de dezembro de 2012.

NCI - NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Advances in Focus**, 2007. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancer-advances-in-focus/colorectal>> Acesso em: 24 de dezembro de 2012.

NCI – NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What you need to know about cancer of the colon and rectum**, 2006. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/colon-and-rectal/page9>> Acesso em: 24 de dezembro de 2012.

NG, S. H. **Characterization of colon cancer cell culture based screening assay to study effects of phenolics acids**. Tese de Mestrado. Departamento de Patologia e Laboratório de Medicina. Universidade de Saskatchewan. Saskatoon, 2011.

OLTHOF, M.R.. et al. Chlorogenic acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenol are extensively Metabolized in Humans. **J. Nutr.**, v.133, p.1806-1814, 2003.

PALOZZA, P. et al. Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase (tlcy-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **Br. J. Nutr.** v. 102, n. 2, p. 207-214, 2009.

PATWARDHAN, M. B. et al. **Cancer Care Quality Measures: Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer**. Evidence Report/Technology Assessment n. 138. (Prepared by the Duke Evidence based Practice Center under contract n. 290-02-0025.) AHRQ Publication n. 06-E002. Rockville, MD. Agency for Healthcare Research and Quality. 2006.

PELLEGRINI, N. et al. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **J. Nutr.**, v.133, p.2812–2819, 2003.

PEREIRA, A.S. et al. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Z. Naturforsch**, v.58c, p.590-593, 2003.

PERRONE, D. et al. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, v.106, p.859–867, 2008.

PINHO, M.S.L. Biologia molecular do câncer colorretal: uma revolução silenciosa em andamento. **Ver. Bras. Coloproct.**, v.28, n.3, p.353-368, 2008.

PLUMB, G. W. et al. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, p.390-392, 1999.

PRIOR, R.L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3273–3279, 2003.

PUANGPRAPHANT, S. et al. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.55, n.10, p.1509–1522, 2011.

RAO, C.V.; DESAI, D.; KAUL, B. Effect os caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. **Chemico-Biological Interactions**, v.84, p. 277-290, 1992.

RECHNER, A. R. et al. "Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo." **Free Radic Biol Med.**, v.30, n.11, p. 1213-1222, 2001.

REITER, L.S. et al. The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. **Int. J. Cancer**, 53, p.444-450, 1993.

RENOUF, M. et al. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: Small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, n.6, p.760-766, 2010.

RICE-EVANS, C; MILLER, N. Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.57, n.4-5, p.499-505, 1997.

RICE-EVANS, C.A. et al. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. **Drug Metabol. Drug Interact.**, v.17, p.291–310, 2000.

ROCHA, L.D.; MONTEIRO, M.C.; TEODORO, A.J. Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids - A Review. **Cancer and Clinical Oncology**, v.1, n.2, 2012.

ROYNETTE, C. et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v.23, p.139–151, 2004.

RUBACK, K. **Dissertação de Mestrado**, Technische Universität, Berlin, 1969.

SALAZAR-MARTINEZ, E. et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Ann. Int. Med.**, v.140, p.1–8, 2004.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 1998.

SANTOS JUNIOR, J.C.M. Câncer An-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II – Câncer Colorretal – fatores de risco e prevenção. **Rev. Bras. Coloproct.**, v.27, n.4, p.459 – 473, 2007.

SARGENT, D. J. et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. **N. Engl. J. Med.** v. 345, n. 15, p.1091-1097, 2001.

SCHARLAU, D. et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutat. Res.**, v.682, p.39-53, 2009.

SCHMIEGEL, W. et al. Colorectal Carcinoma: The Management of Polyps, (Neo)Adjuvant Therapy, and the Treatment of Metastases. **Dtsch Arztebl Int.**, v.106, n.51-52, p. 843–848, 2009.

SERVEI CATALÀ DE LA SALUT. Institut Català d'Oncologia. **El càncer de còlon i recte - informació per a dones i homes afectats**. Barcelona, 2000. 36 p.

SHOKAR, M. K. ; CARLSON, C. A. ; WELLER, S. C. Informed decision making changes test preferences for colorectal cancer screening in a diverse population. **Ann. Fam. Med.**, v.8, n.2, p. 141-150, 2010.

SONDHEIMER, E. On the distribution of caffeic aci and chlorogenic acid isomers in plants.**Arch. Bioch. Bioph.**, v.74, p.131-138, 1958.

STALMACH, A. et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.501, p.98-105, 2010.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14, n.4, p.263-269, 2012.

SUGIMURA, T. Food and Cancer. **Toxicology**, v.181-182, p.17-21, 2002.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p.768-780, 2003.

TAI, J.et al. Antiproliferation Effect of Commercially Brewed Coffees on Human Ovarian Cancer Cells In Vitro. **Nutrition and Cancer**, v.62, n.8, p. 1044-1057, 2010.

TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p.966–970, 1996.

TAPIERO, H. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed Pharmacother**, v.56, p.200-207, 2002.

TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, 109:263–6, 1984.

ULLMAN, T.A.; ITZKOWITZ, S.H. Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**, v.140, p.1807-1816, 2011.

UPADHYAYA, K.R.; RADHA, K.S.; MADHYASTHA, H.K. Cell cycle regulation and induction of apoptosis by beta-carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. **J Biochem Mol Biol.**, v.40, n.6, p.1009-1015, 2007.

U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for colorectal cancer: recommendation and rationale. Clinical Guidelines. **Ann. Intern. Med.**, v.137, n.2, p. 129-131, 2002.

VAN DAM, R.M. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.16, p.69–77, 2006.

VINDELOV, L.L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. **Virchows Arch B Cell Pathol.**, v.24, n.3, p.227–242, 1977.

VITURRO, C.; MOLINA, A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). **Phytotherapy Research.**, v.13, p.422-424. 1999.

WANG, D. et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. **World J Gastroenterol**, v.11, n.26, p.4008-4012, 2005.

WATABE, M. et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF- κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.6017-6026, 2004.

WATANABE, T. et al. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 28, n. 5, p. 439-449, 2006.

WENG, C.; YEN, G. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews.**, v.38, p.76–87, 2012.

WITTEMER, S.M. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. **Phytomedicine**, v.12, n.1-2, p.28-38, 2005.

WOOD, A.W. et al. Inhibition of the Mutagenicity of bay region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenol: Exceptional activity of ellagic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (Biochemistry)**, v.79, p.5513-5517, 1982.

YEATMAN, T.J. **Colon Cancer. Encyclopedia Of Life Sciences.** University of South Florida, Tampa, Florida, USA, 2001. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acessado em: 20 de dezembro de 2012.

XIANG, D. et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the B-catenin/T-cell factor signaling. **Anti-cancer drugs**, v.17, p. 753-762, 2006.

ZAVORAL, M. et al. Colorectal cancer screening in Europe. **World J. Gastroenterol.** v. 15, n. 47, p. 5907-5915, 2009.

ANEXO A - CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR ($\mu\text{g/g}$ de proteína) DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO NAS CÉLULAS HT-29 APÓS INCUBAÇÃO COM MEIO DE CULTURA PADRÃO SUPLEMENTADO COM 5 μM DE CA E 5-CQA DURANTE 96 h.

Composto incubado	Compostos identificados	Tempo (h)									
		0	0.5	1	2	6	12	24	48	72	96
5-CQA	5-CQA	ND ^a	32,95±2,95 ^b	44,42±3,07 ^b	46,05±0,01 ^c	3,26±0,81 ^d	4,82±0,02 ^d	2,63±3,83 ^d	1,53±1,55 ^d	1,96±1,11 ^d	1,11±1,01 ^d
	3-CQA	ND ^a	2,49±0,44 ^a	3,05±3,17 ^a	8,51±0,11 ^b	0,86±0,36 ^a	2,16±0,30 ^a	0,52±0,22 ^a	2,98±1,75 ^a	1,73±0,49 ^a	2,45±0,14 ^a
	4-CQA	ND ^a	ND ^a	ND ^a	7,60±0,60 ^b	0,34±0,58 ^a	ND ^a	1,06±1,84 ^a	ND ^a	1,04±0,33 ^c	ND ^a
	CA	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,76±0,41 ^b	0,72±0,01 ^b
	IsoFA	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	2,02±0,26 ^b	0,46±0,16 ^c	0,30±0,11 ^d	ND ^a	ND ^a	ND ^a
CA	CA	ND ^a	3,36±0,52 ^b	3,55±0,25 ^b	3,92±3,41 ^c	ND ^a	0,23±0,22 ^a	ND ^a	ND ^a	0,29±0,36 ^a	0,25±0,05 ^a
	DHCA	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	26,94±4,6 ^b	8,88±0,42 ^c	17,18±8,2 ^c	ND ^a	13,80±2,11 ^d	ND ^a
	2,4-diOHbenzoico	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,51±0,44 ^b	0,37±0,33 ^b	1,26±0,47 ^c	ND ^a	1,71±0,08 ^c	0,47±0,01 ^a

*Médias com letras diferentes, na mesma linha, são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5-CQA – ácido 5-cafeoilquínico, 3-CQA – ácido 3-cafeoilquínico, 4-CQA – ácido 4-cafeoilquínico, CA- ácido cafeico, IsoFa – ácido isoferúlico, DHCA – ácido dihidrocafeico, 2,4-diOHbenzoico – ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ND – não detectado.

ANEXO B - CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR ($\mu\text{g/g}$ de proteína) DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO NAS CÉLULAS HT-29 APÓS INCUBAÇÃO COM MEIO DE CULTURA PADRÃO SUPLEMENTADO COM 5 μM DE CA E 5-CQA DURANTE 96 h.

Composto incubado	Compostos identificados	Tempo (h)									
		0	0.5	1	2	6	12	24	48	72	96
5-CQA	5-CQA	ND ^a	0,82±0,33 ^a	0,17±0,29 ^a	ND ^a	11,62±0,19 ^b	12,12±0,09 ^b	11,10±0,02 ^b	11,32±1,34 ^b	9,33±2,19 ^b	0,71±0,02 ^a
	3-CQA	ND ^a	1,29±0,29 ^b	1,30±0,05 ^b	1,17±0,06 ^b	1,15±0,06 ^b	1,29±0,01 ^b	1,18±0,03 ^b	1,26±0,07 ^b	1,20±0,04 ^b	1,63±0,00 ^b
	4-CQA	ND ^a	8,00±13,86 ^a	8,93±15,4 ^a	23,95±0,92 ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
CA	CA	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a

*Médias com letras diferentes, na mesma linha, são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5-CQA – ácido 5-cafeoilquínico, 3-CQA – ácido 3-cafeoilquínico, 4-CQA – ácido 4-cafeoilquínico, CA- ácido cafeico, ND – não detectado.

ANEXO C - ARTIGO INTITULADO “ANTICANCER PROPERTIES OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS – A REVIEW”, PUBLICADO NA REVISTA CANCER AND CLINICAL ONCOLOGY, EM NOVEMBRO DE 2012.