

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*
DE EXTRATOS DE CÉLULAS-TRONCO VEGETAIS OBTIDAS A
PARTIR DE CALOS DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner

LUANA DOS SANTOS NOGUEIRA

VILA VELHA
AGOSTO/2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*
DE EXTRATOS DE CÉLULAS TRONCO VEGETAIS OBTIDAS A
PARTIR DE CALOS DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

LUANA DOS SANTOS NOGUEIRA

VILA VELHA
AGOSTO/2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

N778a Nogueira, Luana dos Santos
 Atividade antioxidante e anti-inflamatória in vitro de extratos
 de células tronco vegetais obtidas a partir de calos de *Coffea*
 canephora Pierre ex A. Froehner / Luana dos Santos
 Nogueira - 2023.
 53 f.: il.

 Orientador: Marcio Fronza.
 Coorientador: Victor Paulo Mesquita de Aragão.

 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) –
 Universidade Vila Velha, 2023.
 Inclui bibliografias.

 1. Biotecnologia Vegetal. 2. Celulas-tronco. 3. Café.
 I. Fronza, Marcio. II. Aragão, Victor Paulo Mesquita de.
 III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 660.6

LUANA DOS SANTOS NOGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*
DE EXTRATOS DE CÉLULAS TRONCO VEGETAIS OBTIDAS A
PARTIR DE CALOS DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner**

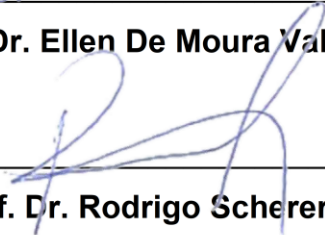
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 29 de agosto de 2023.

Banca Examinadora:



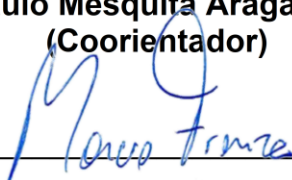
Prof. Dr. Ellen De Moura Vale (UENF)



Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)



**Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão – ICCA/UVV
(Coorientador)**



**Prof. Dr. Marcio Fronza (UVV)
(Orientador)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo bom ânimo em todo tempo, pelo sustento e cuidado diário do início ao fim desse mestrado.

À minha família que tanto me apoiou durante esses anos em momentos bons e ruins. Em especial, meu noivo Thiago, que foi meu porto seguro em momentos de angústia.

Aos meus colegas de laboratório; Antônio, Iana, Tamires, Flávia, Mariana e Moisés, que me ajudaram em tantos experimentos e repetições (risos). O lab 1C de culturas de células mora em meu coração. Gratidão eterna pelo aprendizado, incentivo, empatia e companheirismo nesta jornada.

Agradeço imensamente ao meu orientador Marcio Fronza e coorientador Victor Aragão, que me acolheram, confiaram a mim esse projeto, sempre demonstrando o quanto eu poderia ir além e ser capaz de executar e concluir esse trabalho. Além de grandes pesquisadores, são grandes seres humanos!

Ao apoio financeiro da FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) e da Universidade Vila Velha.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Cultura de tecidos vegetais	16
2.2 Vantagens da cultura de tecidos vegetais na obtenção de compostos bioativos para utilização na indústria de cosméticos e farmacêutica	17
2.3 <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner	19
2.4 Compostos bioativos de origem das plantas X obtidos por biotecnologia...	19
2.5 Atividade antioxidante e anti-inflamatória.....	21
2.6 Cicatrização	22
3. OBJETIVO GERAL.....	25
3.1 Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIAS	26
4.1 Material vegetal.....	26
4.2 Desinfestação do material.....	26
4.3 Indução e cultivo dos calos	26
4.4 Obtenção dos extratos vegetais.....	27
4.5 Quantificação de proteínas	27
4.6 Quantificação de polifenóis totais e flavonoides	27
4.7 Atividade de eliminação de radicais livres.....	27
4.8 Estudos da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	28
4.9 Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	28
4.10 Redução da produção do ânion superóxido.....	28
4.11 Inibição do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em L929.....	29
4.12 Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	29
4.13 Ensaio <i>in vitro</i> de cicatrização de feridas (<i>scratch assay</i>).....	29
4.14 Ensaio de proliferação de BrdU	30
4.15 Análise estatística dos dados.....	30
5. RESULTADOS	30
5.1 Quantificação de proteínas	30
5.2 Conteúdo total de fenólicos e flavonoides.....	31

5.3	Atividade biológica dos extratos.....	31
5.3.1	Ensaio químicos.....	31
5.3.1.1	Atividade antioxidante dos extratos	31
5.4	Estudos biológicos <i>in vitro</i> intracelular	32
5.4.1	Efeitos dos extratos de <i>C. canephora</i> sobre a viabilidade celular.....	32
5.4.2	Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	32
5.4.3	Redução da produção do ânion superóxido <i>in vitro</i>	33
5.4.4	Efeito preventivo contra danos oxidativos causados por H ₂ O ₂ em fibroblastos	34
5.4.5	Redução da produção de citocinas <i>in vitro</i>	35
5.4.6	Ensaio <i>in vitro</i> de cicatrização de feridas (<i>scratch assay</i>)	36
5.4.7	Proliferação de fibroblastos <i>in vitro</i> (BrdU).....	37
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO.....	44
8.	REFERÊNCIAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosagem de proteínas totais extratos de calos de café em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) de *C. canephora*.....29

Tabela 2. Quantificação de polifenóis e flavonoides nos extratos dos calos de café (*Coffea canephora*) cultivados no meio simples (CMS) e no meio composto (CMC).....29

Tabela 3. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos dos calos de café (*Coffea canephora*) cultivados no meio simples (CMS) e no meio composto (CMC).....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) (A) e meio composto (CMC) (B) nas concentrações de 1 a 1000 µg/mL sobre a viabilidade de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média ± D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.....30

Figura 2. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL sobre a concentração de nitrito em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS 1 µg/mL (24 h). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....31

Figura 3. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL sobre a concentração do radical ânion superóxido (O_2^-) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24 h de tratamento. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....32

Figura 4. Efeito protetor extratos de calos de *C. canephora* meio composto (CMC) (A) e meio simples (CMS) (B) de *C. canephora* avaliados em fibroblastos L929 contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações de amostras na presença ou ausência de H_2O_2 . A catalase a 10 UI/mL (CAT) foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP ($n = 2$). #Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo sem H_2O_2 . *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle de H_2O_2 por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey post hoc.....32

Figura 5. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B). Macrófagos RAW 264.7 foram expostos as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL de CMS e CMC na presença ou ausência de LPS (1 µg/mL). Os resultados foram

expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....33

Figura 6. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre a migração de fibroblastos no *scratch assay*. As células foram tratadas com 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos, 2 ng/mL de PDGF ou apenas com meio de cultura, como controle. **(A)** Imagens representativas foram tiradas imediatamente após a lesão (0 h) e após 16 h de incubação a 100 x. **(B)** Porcentagem do número de células após 16 h na área lesionada, em comparação com a área de lesão no momento zero (0 h). As barras representam a média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. *Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos.....34

Figura 7. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* meio simples (CMS) e meio composto (CMC) de *C. canephora* na proliferação de fibroblastos. As células foram tratadas com 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. # grupo controle comparado ao tratamento. *Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos.....34

LISTA DE ABREVIATURA

ANOVA – Análise de Variância	O ₂ ^{•-} - Ânion superóxido
BAP – Benzilaminopurina	OPD – O-Phenilenediamina
BOD – Demanda bioquímica de oxigênio	PBS – Tampão fosfato-salino
BrdU – Ensaio de proliferação celular	PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
CAT – Catalase	PGRs – Reguladores de crescimento vegetal
CMC – Extrato de calos em meio composto	PMSF – Phenylmethylsulfonyl Fluoride
CMS – Extrato de calos em meio simples	PVPP – Polivinilpolipirrolidona
COX2 – Ciclooxygenase 2	Scratch assay – Ensaio de migração celular
DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole	TBS-T – Solução salina tamponada com tris e Polissorbato 20
DMEM – Dubelcco modified Eagle medium	TMB – Tetrametilbenzidina
DMSO – Dimetilsulfóxido	TNF α – Fator de Necrose Tumoral
DP – Desvio padrão	TPA – 12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol
ELISA – Ensaio Imunoenzimático	MS – Murashige e Skoog
EROs – Espécies reativas de oxigênio	EAC – Equivalente de ácido clorogênico
FBS – Soro fetal bovino	GAE – Equivalente de ácido gálico
FRAP – Poder antioxidante de redução férrica;	ABTS ⁺ – 2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)
IC ₅₀ – Concentração do extrato requerida para reduzir a quantidade de radicais livres por 50%	DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
IL-6 – Interleucina 6	2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
LPS – Lipopolissacarídeo	MTT – (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NBT – Cloreto de Nitroazul de Tetrazólio	
NO – Óxido Nítrico	

RESUMO

NOGUEIRA, Luana dos Santos, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, agosto de 2023. **Atividade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* de extratos de células tronco vegetais obtidas a partir de calos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner.** Orientador: Marcio Fronza. Coorientador: Victor Paulo Mesquita de Aragão.

No Brasil, o café é um dos principais produtos agrícolas com grande relevância no mercado nacional e internacional. Por sua vez, o estado do Espírito Santo é o maior produtor de *Coffea canephora* do país. Além do alto valor econômico agregado a bebida, o café possui diversos constituintes com propriedades biológicas benéficas a saúde, com destaque para a atividade antioxidante e anti-inflamatória. Assim, a cultura de tecidos vegetais, através do cultivo de calos pode ser uma eficiente ferramenta para a obtenção de bioativos com potencial farmacológico e/ou cosmético. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* em extratos de células-tronco vegetais oriundos de calos obtidos a partir de folhas de *C. canephora* e cultivados em diferentes meios de cultura. Explantes foliares foram utilizados para a obtenção dos calos que foram cultivados em meio simples (CMS) e em meio composto (CMC). Após duas repicagens, os calos foram submetidos a extração aquosa na proporção de 10% (m/v). A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio de determinação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e sequestro dos radicais livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A composição fitoquímica foi determinada pela quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). A atividade anti-inflamatória foi estudada em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeos (LPS), pela inibição na produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). A atividade estimulatória sobre a proliferação e migração de fibroblastos foi avaliada pelo teste colorimétrico BrdU que quantifica a síntese do DNA e pelo *scratch assay*, respectivamente. Os resultados alcançados revelam que o extrato CMC (61,74 mg/100g) demonstrou teores superiores de polifenóis em comparação com o extrato CMS (32,48 mg/100g), além de exibir um efeito antioxidante superior nos testes do DPPH e ABTS. O teor flavonoides e proteínas totais não apresentaram diferença significativa entre os extratos. CMS e CMC apresentaram ação protetora ao dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promoveram a proliferação e migração de fibroblastos e suprimiu a produção de importantes mediadores pró-inflamatórios como $O_2^{\bullet-}$ e NO e as citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 de forma dose-dependente. Os resultados alcançados contribuem para a validação das propriedades biológicas presentes nos extratos de células-tronco de café, representando uma pesquisa inédita na utilização de extratos de calos de *C. canephora*. Consequentemente, pode-se concluir que esses extratos oferecem novas perspectivas para a obtenção de compostos bioativos com potenciais aplicações nas áreas farmacêutica e/ou cosmética.

Palavras-chaves: café, cultivo *in vitro*, calos, células-tronco, bioativos.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Luana dos Santos, M.Sc., Vila Velha University - ES, august 2023. ***In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of plant stem cell extracts obtained from callus of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner.** Advisor: Marcio Fronza. Coadvisor: Victor Paulo Mesquita de Aragão.

In Brazil, coffee is one of the main agricultural products with significant importance in both the national and international markets. In turn, the state of Espírito Santo is the largest producer of *Coffea canephora* in the country. Besides the high economic value associated with the beverage, coffee contains numerous constituents with beneficial biological properties for health, particularly notable for their antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, plant tissue culture, specifically the cultivation of callus, can serve as an efficient tool for obtaining bioactive compounds with pharmaceutical and/or cosmetic potential. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from plant stem cells derived from callus obtained from *C. canephora* leaves and cultivated in different culture media. Leaf explants were used to generate callus, which was cultured in a simple medium (CMS) and a composite medium (CMC). After two subcultures, the callus was subjected to aqueous extraction at a proportion of 10% (w/v). The antioxidant activity of the extracts was assessed using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay and the scavenging of free radicals, specifically 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The phytochemical composition was determined by quantifying total phenolic and flavonoid compounds. Cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The anti-inflammatory activity was studied in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting the production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6). The stimulatory effects on fibroblast proliferation and migration were assessed using the bromodeoxyuridine (BrdU) colorimetric assay, which quantifies DNA synthesis, and the scratch assay, respectively. The results obtained reveal that the CMC extract (61.74 mg/100g) exhibited higher polyphenol content compared to the CMS extract (32.48 mg/100g), in addition to demonstrating superior antioxidant effects in the DPPH and ABTS tests. The levels of flavonoids and total proteins did not show significant differences between the extracts. Both CMS and CMC extracts demonstrated protective action against oxidative damage caused by hydrogen peroxide (H_2O_2), promoted fibroblast proliferation and migration, and suppressed the production of important pro-inflammatory mediators such as $O_2^{\bullet-}$, and NO, as well as inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, in a dose-dependent manner. The achieved results contribute to the validation of the biological properties present in coffee stem cell extracts, representing innovative research in the utilization of callus extracts from *C. canephora*. Consequently, it can be concluded that these extracts offer new perspectives for obtaining bioactive compounds with potential applications in the pharmaceutical and/or cosmetic fields.

Keywords: coffee, *in vitro* culture, callus, stem cells, bioactive.

1. INTRODUÇÃO

O café é uma planta arbustiva pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* que abrange atualmente, 130 espécies (DAVIS et al., 2019; HAMON et al., 2017). Dentre as espécies catalogadas destacam-se *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon e robusta), sobretudo por proporcionarem melhor qualidade sensorial à bebida frente as outras espécies do gênero (LEMOS et al., 2020).

No Brasil, o café é um dos principais produtos agrícolas e apresenta grande relevância no mercado nacional e internacional, visto que o país é o maior produtor e exportador do mundo (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2021). Dados recentes demonstram que a produção nacional engloba tanto os grãos de *C. arabica* que representa cerca de 70-75%, quanto grãos de *C. canephora* representando, aproximadamente, 25-30% de toda produção nacional (VENIAL et al., 2020) e 40% da produção mundial (ICO, 2022).

O estado do Espírito Santo contribui significativamente para a produção nacional de café, sendo o segundo maior produtor deste grão no país (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2021). Por sua vez, o Norte do Estado se destaca no cultivo das variedades de *C. canephora* (FERRÃO et al., 2017). Desta forma, o café tem grande importância e influência para o desenvolvimento econômico regional e nacional (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015). No cenário de expansão comercial, tanto o *C. arabica*, quanto *C. canephora* podem ser consideradas as espécies de maior importância, em que a última é considerada por muitos como estratégica, devido à prevalência de suas características agronômicas, como alta produtividade, resistência a pragas e doenças e tolerância ao estresse abiótico, proporcionando sua expansão em várias regiões do mundo (DUQUE-CAMPUZANO et al., 2021; PARTELLI et al., 2022; AQUINO et al., 2022).

O café possui inúmeros compostos químicos que influenciam não somente no aroma e sabor (LEMOS et al., 2020), mas também são responsáveis por atribuírem diversas propriedades biológicas que podem estar presentes desde os grãos até as folhas (CHEN, 2019). A presença de compostos fenólicos e alcaloides em *C. arabica* e *C. canephora* conferem importantes propriedades biológicas a estas espécies, tais como, atividade antioxidante (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015), anti-inflamatória (JUNG et al., 2017), antitumoral (NIGRA et al., 2021) e fotoprotetora (KITAGAWA et al., 2011). Estudos afirmam que seu consumo diário causa impacto

na redução da incidência de uma série de doenças, como: diabetes mellitus tipo 2, mal de Alzheimer e de Parkinson, doenças coronarianas em geral, doenças crônicas do fígado, entre outras (VAN; HU, 2020; DI et al., 2021; HOU et al., 2022; LIU et al., 2022).

Esta diversidade de propriedades e benefícios descritos para as espécies de café tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética. Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais destaca-se como uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada para a produção em larga escala de metabólitos secundários para serem usados em produtos farmacêuticos, alimentos, cosméticos e indústrias relacionadas. Culturas de tecidos vegetais de plantas medicinais produzem compostos bioativos que podem ser usados para tratar uma ampla variedade de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (AZIZ, et al., 2003; KARWASARA, et al., 2010; ISAH, et al., 2018).

Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo a obtenção e o cultivo *in vitro* de calos provenientes de folhas de *C. canephora*, utilizando diferentes meios de cultura, com o propósito de estabelecer as condições mais eficientes para o cultivo e produção de metabólitos, particularmente compostos fenólicos totais e flavonoides. Além disso, visou correlacionar e avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Cultura de tecidos vegetais

A técnica de cultura de células e tecidos vegetais consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições controladas de assepsia, temperatura, luz, umidade e meios de cultivo apropriados (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009). Dentre as técnicas existentes, a micropropagação é uma das mais conhecidas, pois consiste na propagação clonal de plantas a partir de células, tecidos ou órgãos (ERIG; SCHUCH, 2005). Em adição, a regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer por duas vias embriogênicas, direta ou indireta, isto é, o embrião somático se origina diretamente do explante ou se desenvolve de células de calo, depois de um período de proliferação (GUERRA, 1999).

Essa capacidade de proliferação e diferenciação das células vegetais é denominada de totipotência, que é uma característica das células vegetais (TORRES et al., 2000). Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais existentes, a cultura de calos pode ser definida como o cultivo de um conjunto de células agregadas de aparência amorfa, textura friável, com coloração variando de incolor a tons de castanho-claro, oriundos de pequenos fragmentos de tecidos vegetais, que sofrem desdiferenciação formando uma massa celular em constante proliferação, além de nele, conter todas as informações genéticas de uma planta inteira (EFFERTH, 2019; FEHÉR, 2019).

A produção de calos possui grande potencial para diversas aplicações, que podem ser utilizados na indústria em um produto biotecnológico, para fins terapêuticos, para a produção de plantas agrícolas por regeneração celular, produção de anticorpos terapêuticos, dentre outras finalidade (EFFERTH, 2019). A formação de calos também é importante na biotecnologia vegetal para conservação de espécies ameaçadas de extinção, como o pau-brasil (WERNER et al., 2010) e espécies utilizadas para consumo humano, como o adoçante *Stevia rebaudiana*, o cupuaçu e o cacau (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004; AHMAD et al., 2011).

Em se tratando de cultura de tecidos, este método consiste, na verdade, no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico. Baseia-se no fato, amplamente aceito, de qualquer célula do organismo vegetal é “totipotente”. Isto é, detém em seu núcleo toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, estando, portanto, apta

a dar origem, por si só, a uma nova planta, quando submetida a condições adequadas (TEXEIRA, 1983).

Diante do exposto, as espécies de *Coffea ssp.* demonstram uma grande capacidade para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, uma vez que, já existem relatos na literatura descrevendo diversas atividades biológicas em seus variados extratos. Castaldo et al. (2018), avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos da casca de café arábica através da determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima, e identificou que extratos metanólicos da casca de café apresentaram atividade antimicrobiana contra *Penicillium camemberti*, *Penicillium. expansum*, *Penicillium. roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Além disso, Rebollo Hernanz et al., (2019), avaliaram o potencial inibitório de extratos aquosos da casca de café arábica e seus compostos na adipogênese, inflamação relacionada à obesidade, disfunção mitocondrial e resistência à insulina *in vitro*. Os resultados mostraram que os extratos reduziram o acúmulo de lipídios e consequentemente o aumento da atividade mitocondrial em adipócitos 3T3-L1.

Além disso, Guidoni et al. (2023), realizou um estudo *in vitro* em que o extrato aquoso de células-tronco em suspensão de *C. canephora* foi capaz de reduzir significativamente a concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α em cultura de macrófagos estimulados por LPS atribuída pelos autores pela supressão d fator de transcrição NF-KB.

2.2 Vantagens da cultura de tecidos vegetais na obtenção de compostos bioativos para utilização na indústria de cosméticos e farmacêutica

A busca por novas fontes de produtos naturais e fármacos provenientes de plantas tem aumentado significativamente (FOGLIO et al., 2006). Nesse contexto, a aplicação de abordagens biotecnológicas emerge como uma alternativa cativante na produção de metabólitos secundários derivados de plantas. Essa abordagem visa aprimorar a otimização industrial e mitigar a sobre-exploração dos recursos naturais (ISAH et al., 2018).

Os sistemas de cultura *in vitro* de plantas que são utilizados para a produção de metabólitos secundários são diversos, podendo ser culturas de raízes, culturas de brotos, culturas de calos, suspensão de células, cultura de plantas produzidas por micropropagação entre outras (PERASSOLO et al, 2017; UDOMSIN et al, 2018).

A micropropagação pode ser uma atividade comercial atraente para a produção de plantas de alta qualidade e oferece vantagens sobre as práticas convencionais de

propagação (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006). Assim, a propagação *in vitro* é uma alternativa sustentável para a produção em larga escala de espécies com valor medicinal e econômico. A utilização de substâncias que desencadeiam a resposta de defesa de plantas e células em cultivo *in vitro* é considerada um excelente método biotecnológico para a produção de compostos secundários (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016; ISAH et al., 2018).

O cultivo de plantas visando a obtenção de compostos químicos enfrenta múltiplas complexidades. Isso decorre do fato de que as espécies vegetais prosperam de maneira otimizada em ambientes que promovem seu crescimento, como solos com os nutrientes e o pH adequados, além de condições de temperatura e umidade ideais. O cultivo em campo, por sua vez, requer um espaço considerável para o desenvolvimento das plantas e exige a implementação de técnicas para prevenir doenças e evitar a predação (ANDRADE, 2002; MORAIS, 2012; GONÇALVES; ROMANO, 2013).

De maneira geral, cultivar essas plantas *in vitro*, por meio das técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos, apresenta vantagens significativas. Isso se deve à possibilidade de realizar o cultivo em espaços reduzidos, utilizando meios de cultura ideais que contenham a quantidade apropriada de fonte de carbono, macronutrientes, micronutrientes e reguladores de crescimento. Além disso, a utilização de protocolos repetíveis confere a flexibilidade de aplicação em diversos locais. Essa abordagem permite impulsionar o rápido crescimento das células ou órgãos e amplificar a produção dos compostos do metabolismo secundário de interesse (ISAH et al., 2018).

As culturas celulares, são portanto, amplamente utilizadas uma vez que, com esse método, a quantidade de compostos produzidos pode ser maior quando comparada às plantas em campo, podendo produzir os compostos desejados em larga escala, diminuindo a área necessária para a produção, além de reduzir a demanda extrativista pela coleta de plantas diretamente do ambiente natural, contribuindo para a conservação dos recursos naturais, uma vez que os sistemas de cultura *in vitro* podem ser mantidos em laboratórios (SARKATE et al, 2017; CAI et al., 2012). Com o cultivo *in vitro* existe ainda a possibilidade de manipular o meio em que a cultura irá crescer, adicionando-se os reguladores de crescimento mais adequados, nutrientes e elicitores, a fim de se obter uma eficiência máxima da produção de metabólitos secundários (PERASSOLO et al, 2017).

2.3 *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner

No Brasil, o café figura como um dos principais produtos agrícolas, desempenhando um papel crucial nos mercados tanto nacional quanto internacional. O país detém a posição de maior produtor e exportador mundial desse produto (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2021). Dados recentes revelam que a produção nacional abrange tanto os grãos de *C. arabica*, que compreendem cerca de 70-75% do total, quanto os grãos de *C. canephora*, que correspondem a aproximadamente 25-30% da produção total (VENIAL et al., 2020).

O estado do Espírito Santo desempenha um papel significativo na produção nacional de café, ocupando a posição de segundo maior produtor desse grão no país (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2021). Por sua vez, o Norte do Estado se destaca no cultivo das variedades de *C. canephora* (FERRÃO et al., 2017). Desta forma, o café tem grande importância e influência para o desenvolvimento econômico regional e nacional.

A presença de compostos fenólicos e alcaloides em *C. arabica* e *C. canephora* conferem importantes propriedades biológicas a estas espécies, tais como, atividade antioxidante (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015), anti-inflamatória (JUNG et al., 2017), antitumoral (NIGRA et al., 2021), fotoprotetora (KITAGAWA et al., 2011), dentre outras. Esta diversidade de propriedades descritas para as espécies de café tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética. Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais destaca-se como uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada na busca e produção de metabólitos primários e secundários de interesse. Logo, a investigação bioquímica em *C. canephora* é relevante, para que a partir desse trabalho novos surjam, visando o aprimoramento e avanço da biotecnologia vegetal nesta espécie, com enfoque na produção de novos produtos que valorizem ainda mais o café produzido no país.

2.4 Compostos bioativos de origem das plantas X obtidos por biotecnologia

As plantas possuem dois tipos de metabolismo, o metabolismo primário e secundário. As funções essenciais das plantas, como crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e reprodução são desempenhadas pelo metabolismo primário, a partir dos processos de fotossíntese, síntese de aminoácidos e proteínas, absorção de nutrientes, entre outros (BÖTTGER et al., 2018), que garantem a função vital da planta. Por outro lado, o metabolismo secundário está associado a adaptação das

plantas a fatores bióticos e abióticos provenientes do ambiente ao qual ela está inserida (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O metabolismo primário da origem ao metabolismo secundário, estabelecendo as rotas biossintéticas que permitem a formação de diferentes grupos de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, alcaloides e terpenos, entre outros (KABERA et al., 2014). Esses compostos desempenham funções de defesa química contra herbívoros e patógenos, sendo também responsáveis por atribuir cor, odor e sabor aos vegetais (BÖTTGER et al., 2018). Acresce que, apresentam ação protetora associada as mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a raios ultravioleta e deficiência de nutrientes e minerais (YANG et al., 2018). Portanto, o conteúdo de metabólitos secundários varia de acordo com as condições ambientais as quais a planta é exposta.

Matthew e Sankar (2014), quantificaram os principais metabólitos secundários de espécies do gênero *Ocimum* através de culturas *in vivo* e culturas de calos *in vitro*, com e sem elicitores. Maiores conteúdos de fenólicos, alcaloides e terpenóides foram encontrados nas culturas de calos *in vitro* com elicitores. Em adição, Deepthi e Satheeshkumar (2016), obtiveram uma produção de camptotecina três vezes maior em suspensão celular de calos de *Ophiorrhiza mungos*, em relação aos níveis encontrados na planta *ex vitro*. O aumento na produção de substâncias fenólicas e tocoferóis, também foi observado em culturas de calos de *Vitis vinifera* cultivados na presença de elicitores (CETIN, 2014; CETIN et al., 2014).

Costa et al. (2012), investigaram a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos em plantas silvestres *Thymus lotocephalus* e cultura *in vitro* em diferentes solventes. Os resultados revelaram que extratos a base de água em calos apresentaram maiores concentrações de ácido caféico (82,4%), luteolina (9,1%) e apigenina (8,5%), do que as partes aéreas das plantas coletadas à campo, apresentando assim um maior potencial antioxidante *in vitro*.

Diante do exposto, a cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta eficiente para a produção em larga escala de biomassa vegetal para a extração de metabólitos secundários de interesse, sem que ocorra a exploração predatória de populações selvagens. Uma vez que os demais métodos de cultivo vegetal são muitas vezes limitados, onerosos e demandam mais tempo para produção dos metabólitos (GONÇALVES; ROMANO, 2013; MORAIS et al., 2012).

2.5 Atividade antioxidante e anti-inflamatória

O uso de produtos de origem vegetal para benefícios a saúde humana é milenar (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019). Entretanto, nas últimas décadas, os compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos, têm se destacado pela atividade antioxidante que pode atuar na prevenção ou no tratamento de algumas doenças, por desempenhar um papel importante contra o estresse oxidativo (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou de nitrogênio e as defesas antioxidantes, causando processos deletérios a nível celular (TURRENS, 2003). Por sua vez, as espécies reativas de oxigênio, (peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxila), são uma variedade de moléculas e radicais livres derivadas do oxigênio molecular que apresentam um elétron desemparelhado em sua última camada (LIOU; STORZ, 2010; TURRENS, 2003). Essa característica confere um alto potencial de reatividade as EROs, tornando-os moléculas instáveis e capazes de transformar outras moléculas com as quais interagem. Assim, os compostos fenólicos desempenham um papel relevante no estresse oxidativo e podem atuar de maneira preventiva e/ou no tratamento de importantes doenças, pois as EROs estão envolvidas no desenvolvimento de diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, câncer, asma, artrite reumatoide, processos inflamatórios, dentre outros (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Rodrigues; Salva; Bragagnolo (2015), descreveram que o extrato hidrofílico de grãos de *C. canephora* exibiu uma alta eficiência na eliminação de diversas espécies de EROs, cuja atividade foi atribuída ao elevado teor de ácidos clorogênicos. Em adição, Babova; Occhipinti; Maffei (2016), obtiveram alta atividade antioxidante em extratos de grãos verdes de diferentes genótipos de *C. canephora*. Já Pinheiro et al., (2021), avaliou a capacidade antioxidante de flores de *C. canephora* e *C. arabica*, e concluiu que em *C. canephora* há um maior teor de compostos fenólicos e consequentemente, capacidade antioxidante. Recentemente, um estudo realizado por Guidoni et al. (2023), com extrato aquoso de células-tronco de *C. capenhora* apresentou interessante atividade antioxidante em eliminar radicais livres, a presença de compostos fenólicos e flavonoides, além de atividade anti-inflamatória, suprimindo os danos causados pelo estresse oxidativo e efeito migratório significativo em fibroblastos.

A inflamação é uma reação protetora iniciada após a presença de patógenos ou lesão tecidual (HEADLAND; NORLING, 2015). As respostas inflamatórias, tem por objetivo eliminar o estímulo iniciante e promover reparação tecidual (FULLERTON; GILROY, 2016). A resposta inflamatória tem início através de um complexo mecanismo que envolve macrófagos teciduais, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos ativando um programa de citocinas pró-inflamatórias para amplificar a resposta imune (FULLERTON; GILROY, 2016; HEADLAND; NORLING, 2015). O estresse oxidativo e o processo inflamatório estão intrinsecamente relacionados, visto que a produção de EROs pode modular vários fatores de transcrição induzidos por estresse, como AP-1, p53 e NF-kB responsáveis por regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, diferenciação celular e apoptose (BIRBEN et al., 2012; BURTON; JAUNIAUX, 2011). O efeito anti-inflamatório do café pode ser observado no estudo de Jung et al., (2017), onde extratos aquosos diminuíram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios. Além disso, Nigra et al., (2021), demonstrou que extratos aquosos de grãos de *C. canephora* teve efeito antiproliferativo e citotóxico em células de câncer de mama em modelos de cultura celular 2D e 3D sem afetar a viabilidade de células mamárias saudáveis.

Guidoni et al. (2023), também avaliou que o extrato aquoso de células-tronco de *C. canephora* foi capaz de reduzir significativamente a concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Outro estudo inédito realizado por Guidoni et al. (2022), avaliou através de uma mistura lipossomal com extrato aquoso de células-tronco de *C. canephora* uma melhora na resposta inflamatória, com a capacidade de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e melhora na cicatrização de feridas.

Diante do exposto, o expressivo potencial antioxidante de *C. canephora* descrito neste trabalho, leva a sugerir que os extratos de célula-tronco do café conilon podem ser uma alternativa para minimizar o estresse oxidativo, e consequentemente o processo inflamatório e seus danos à pele.

2.6 Cicatrização

Uma ferida pode ser definida como um rompimento da estrutura anatômica da pele, com a perda da funcionalidade celular normal. O processo de cicatrização da ferida é um complexo que envolve a interação de diferentes células sanguíneas, componentes da matriz extracelular e mediadores solúveis, como fatores de crescimento e citocinas para repor a integridade estrutural e funcional do tecido

lesionado. A cicatrização de feridas cutâneas é um processo biológico multifacetado que pode ser dividido em três ciclos sobre postos: inflamação, reepitelização e remodelagem ou maturação do tecido (CAMPOS et al., 2007; REIKE et al., 2012; KONDO et al., 2017; ERTL et al., 2018).

Essa fase é iniciada no momento que ocorre a lesão, com exposição de sangue dos vasos rompidos, ativação de plaquetas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular. O coágulo formado, em conjunto com uma matriz de fibrina formada, promove uma barreira impermeabilizante que impede a contaminação e permite um suporte para as futuras células migratórias. Simultaneamente, citocinas e fatores de crescimento são liberados, assumindo importante papel no recrutamento de células inflamatórias para o local da ferida, aumentando o fluxo dessas células para o debridamento (fase inflamatória), formação de tecido de granulação (angiogenese), proliferação de fibroblastos, formação de matriz extra-celular e colágeno, reepitelização e finalmente a remodelação do tecido (ISAAC et al, 2010; YATES et al, 2012).

A fase inflamatória depende de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como as polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase (BEHM et al., 2012). Permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, debrida corpos estranhos, e direciona o desenvolvimento do tecido de granulação. Além da presença de células e mediadores inflamatórios, conta com p importante papel da fibronectina (CLARK, 1998). Sintetizada por uma variedade de células como os fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente a fibrina, ao colágeno, e a outros tipos de células funcionando como cola, para estabilizar o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz (BARRIENTOS et al., 2008).

A fase proliferativa ou de formação do tecido é responsável pelo fechamento da ferida propriamente dita. A primeira fase é a reepitelização, que ocorre pela migração de queratinócito não-danificados da borda da ferida, em direção ao centro. Fatores de crescimento são responsáveis pelo elevado número de mitoses e hiperplasia do epitélio (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende do

fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico (WERNER e GROSSE, 2003). A última fase da proliferação é a angiogenese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização.

A remodelação do tecido é a última das fases, ocorre no colágeno e na matriz; dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON et al., 1985).

Um estudo recente realizado por Guidoni et al. (2022), avaliou a aplicação tópica de uma mistura lipossomal com extrato de células-tronco em suspensão de *C. canephora* na cicatrização de feridas em ratos. Esse trabalho teve como resultado uma melhora eficiente na regeneração tecidual, refletindo em uma rápida cicatrização da ferida com redução da inflamação no local da lesão, quando comparado ao grupo controle, especialmente durante a fase de reepitelização. Guidoni et al. (2022), também verificou um aumento significativo quanto a produção e deposição de colágeno no local da ferida durante a fase mais importante da proliferação de células fibroblásticas. Além de diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α e aumentar a produção e liberação de interleucinas anti-inflamatórias, como IL-10, demonstrando ser um produto com propriedades que podem modular o processo inflamatório causado na pele e ser interessante não só para a cicatrização de feridas, mas também para outras doenças em que o processo inflamatório está presente.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* em extratos de células-tronco vegetais oriundos de calos obtidos a partir de folhas de *C. canephora* cultivados em diferentes meios de cultura

3.1 Objetivos específicos

- Estabelecer condições de cultivo *in vitro* para obtenção de calos a partir de folhas de *C. canephora*;
- Selecionar o melhor meio de cultivo para a produção de metabólitos bioativos;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e proteínas;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos;
- Avaliar os efeitos dos extratos de calos de *C. canephora* sobre a proliferação e migração de fibroblastos.

4. METODOLOGIAS

4.1 Material vegetal

Folhas de *C. canephora* (clone 501) foram coletadas na Fazenda São Luiz, no Sítio Esperança (20°52'58.2"S 41°19'27.7"W), na zona rural do município de Muqui no estado do Espírito Santo, Brasil.

4.2 Desinfestação do material

Após a coleta, as folhas foram transferidas para o laboratório e desinfestadas superficialmente. Para a assepsia, foram selecionadas folhas expandidas, com coloração verde intensa e sem sinais de lesões, doenças ou ataque de insetos. As folhas foram lavadas em água corrente por 3 vezes durante 5 minutos, imersas em etanol 70% (v/v) por 2 minutos, seguida por imersão durante 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2,5% de cloro ativo. Por fim, foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar (Guidoni et al., 2022).

4.3 Indução e cultivo dos calos

A indução dos calos foi realizada em dois meios de cultura, denominados de meio de cultura simples e meio de cultura composto. Para o meio de cultura simples, foi utilizado o meio de cultura Murashige e Skoog (MS) meia força (Metade da concentração de nutrientes totais recomendada) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo sacarose (20 g/L), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a 10 µM e Phytigel® (2,0 g/L) segundo Souza et al., (2015) com adaptações. Para o meio de cultura composto foi utilizado meio de cultura MS meia força suplementado com vitaminas de Gamborg's (10 mL/L) (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), sacarose (30 g/L), L-cisteína (0,08 g/L), extrato de malte (0,4 g/L), caseína (0,1 g/L), 2,4-D (9,06 µM), benzilaminopurina (BAP) (4,44 µM) e Phytigel® (2,8 g/L) de acordo com Venial et al., (2020). Ambos os meios de cultura foram ajustados para um pH de 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos à 1,5 atm. Explantes oriundos das folhas, foram inoculados em ambos os meios de cultura e mantidos em câmara de crescimento tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) no escuro à 25 ± 2 °C por 45 dias para a indução dos calos. Foram inoculados 40 explantes para cada meio de cultura, sendo cada explante individualizado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio.

Os calos friáveis obtidos, foram transferidos e subcultivados duas vezes em intervalos de 45 dias para o aumento e multiplicação da massa celular. Após isso, os calos foram coletados para obtenção dos extratos vegetais.

4.4 Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos foram preparados de acordo com Guidoni et al. (2022). Os calos cultivados em meio simples e composto foram triturados por 5 minutos em blender com água deionizada na proporção de 10% (m/v). Depois, os extratos foram colocados em ultrassom por 16 minutos e centrifugados a 6000xg por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado, congelado a -80 °C overnight e liofilizado. Após a liofilização, os extratos de calos de café do meio simples (CMS) e composto (CMC) foram armazenados a -20 °C até a realização dos experimentos.

4.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford, conforme descrito por Lorençoni et al. (2021). Para o ensaio foram utilizados 5 µL de amostra e 200 µL do reagente Bradford. A curva padrão foi feita utilizando albumina sérica bovina e as leituras foram realizadas a 595 nm, sendo os resultados expressos em µg/mL.

4.6 Quantificação de polifenóis totais e flavonoides

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ESQUIVEL-ALVARADO et al., 2020). O conteúdo de fenólicos totais do CMS e CMC foram expressos em mg equivalentes de ácido clorogênico (EAC)/100 g de extrato. O teor de flavonoides totais foi determinado por método espectrofotométrico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ)/ 100 g em ambos os extratos.(XU; CHANG, 2007).

4.7 Atividade de eliminação de radicais livres

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos colorimétricos do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (RE et al., 1999), sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958) e a capacidade redutora do íon Fe^{3+} para o íon Fe^{2+} pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados serão expressos como valor de IC₅₀ (mg/mL).

4.8 Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica foi realizada pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (MOSMANN, 1983). Foram utilizadas culturas de células de fibroblastos (L929) e macrófagos RAW 264.7. As culturas foram incubadas com diferentes concentrações (1-1000 µg/mL) dos extratos por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, a cultura foi incubada com o MTT por 2 horas e em seguida será adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos com agitação para dissolução dos cristais de formazana. A leitura da absorbância das placas foi realizada em leitor de ELISA (Elisa Spectracount Packard – EUA) a 595 nm.

4.9 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

Para quantificação indireta de óxido nítrico (NO) foi empregado cultura de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). As células foram expostas a diferentes concentrações (1-1000 µg/mL) dos extratos e após 24 horas, o sobrenadante será utilizado para a quantificação de nitrito pelo reagente de Griess (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletilenodiamina em água; 1:1). A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio (GREEN et al., 1982). Os resultados foram expressos como valor médio de nitrito em µM.

4.10 Redução da produção do ânion superóxido

O potencial efeito inibitório dos extratos sobre a produção do radical superóxido (O₂^{•-}) foi determinado em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (CHOI; KLESSIG, 2016; PINHO et al., 2011; STURROCK et al., 2006). Os macrófagos foram pré-tratados em concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) dos extratos e estimuladas 24 horas com LPS na concentração de 1 µg/mL. Após incubação por 20 horas (5% de CO₂ a 37°C) o sobrenadante foi removido e adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL), seguido de incubação por 2 horas. Em seguida, os cristais de formazana formados foram dissolvidos e a densidade óptica mensurada a 630 nm, usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção de ânion superóxido.

4.11 Inibição do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em L929

O efeito protetor dos calos de café contra o dano oxidativo e toxicidade do peróxido de hidrogênio em fibroblastos L929 foi avaliado pelo ensaio do peróxido de hidrogênio (ANNAN; HOUGHTON, 2008; ADETUTU; MORGAN; CORCORAN, 2011). As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas overnight. Após incubação adicionou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 125 µM, seguida de adição com diferentes concentrações (1,10,100 e 1000 µg/mL) dos extratos por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). Utilizou-se a catalase na concentração de 10 UI/mL como controle positivo. Após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT e os resultados expressos em porcentagens de células vivas. Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos dois dias diferentes (SCHERER, 2017).

4.12 Determinação de citocinas *in vitro*

Macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir de 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1, 100, 1000 µg/mL) dos extratos por 60 minutos antes da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 µg/mL). Decorridas 24 horas, o sobrenadante celular foi utilizado para quantificação da citocina fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”). Para tal, a citocina foi detectada através de anticorpos de captura, e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com instruções do fabricante (eBioscience®). Como substrato, foi utilizado o-Phenylenediamine (OPD) ou 2,3 tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de citocina foi determinada pela equação da reta comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para a citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras.

4.13 Ensaio *in vitro* de cicatrização de feridas (*scratch assay*)

O ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* foi realizado conforme descrito por (FRONZA et al., 2008). Resumidamente, os fibroblastos foram cultivados em placas de 6 poços até formarem monocamadas de células quase confluentes para realizar

uma ferida linear artificial. As placas foram lavadas com solução salina estéril (PBS) com a finalidade de remover as células durante a realização da ferida. Em seguida, as monocamadas foram tratadas por 16 horas com diferentes concentrações dos extratos de calos CMS e CMC (10, 100 e 1000 µg/mL). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foi usado como controle positivo. Após a incubação, as células foram fixadas e coradas com 2-(4-amidinofenil)-1-indole-6-carboxamida (DAPI) e a migração celular para a área ferida foi quantificada usando o software CellC® (Finlândia). Os resultados são descritos como porcentagem de células que migraram e/ou proliferaram na área lesionada em comparação com o grupo de controle não tratado.

4.14 Ensaio de proliferação de BrdU

O efeito sobre a proliferação de fibroblastos foi determinado utilizando Kit de quantificação da proliferação celular – BrdU. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 30.000 células/poço, com 90 µL de meio Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C, 5% de CO₂. Após 24 horas, os efeitos do extrato de calos de café nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL na proliferação de fibroblastos foram medidos com o análogo de timidina BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), após sua incorporação no DNA recém-sintetizado e sua detecção subsequente com um anticorpo anti-BrdU de acordo com as instruções e especificações do fabricante (Roche® Mannheim, Alemanha).

4.15 Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software R (R Foundation for Statistical Computing, version 3.1.1, 2014, Vienna, Austria). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de proteínas

A tabela 1 apresenta a concentração de proteínas totais nos extratos de calos de café em CMS e CMC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas.

Tabela 1. Quantificação de proteínas totais nos extratos de calos de café em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) de *C. canephora*.

Amostras	Concentração de proteínas
	(mg/mL)
CMS	31,1 ± 0,9 ^a
CMC	34,1 ± 0,5 ^a

Os resultados foram expressos como média ± DP (n=3). Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p<0,05).

5.2 Conteúdo total de fenólicos e flavonoides

A tabela 2 descreve a quantificação de fenólicos totais e flavonoides. Foram identificadas diferenças significativas entre os polifenóis presentes no CMC e no CMS. É notável que os valores de polifenóis no CMC (61,74 mg/100g) foram superiores em comparação com os do CMS (32,48 mg/100g) (Tabela 2). No que diz respeito ao teor de flavonoides, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes meios de cultivo utilizados (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de polifenóis e flavonoides nos extratos dos calos de café (*Coffea canephora*) cultivados no meio simples (CMS) e no meio composto (CMC).

Extratos de calos de café	Polifenóis	Flavonoides
	•mg de ácido clorogênico/100g	*mg de quercetina/100g
CMS	32,48 ± 2,32 ^b	21,91 ± 1,28 ^a
CMC	61,74 ± 1,94 ^a	22,70 ± 1,53 ^a

CMS: extrato de calos de café meio simples; CMC: extrato de calos de café meio composto. *resultados expressos em mg de equivalentes de ácido clorogênico em 100g de amostra; • resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina em 100g de amostra. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p<0,05).

5.3 Atividade biológica dos extratos

5.3.1 Ensaios químicos

5.3.1.1 Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante dos extratos de CMC e CMS foram avaliadas usando quatro ensaios químicos de sequestro dos radicais livres diferentes e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Maiores IC₅₀ foram observados em amostra CMC nos métodos DPPH e ABTS, enquanto para CMS foi encontrado uma maior atividade antioxidante no método FRAP.

Tabela 3. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos dos calos de café (*Coffea canephora*) cultivados no meio simples (CMS) e no meio composto (CMC).

Amostras	DPPH	ABTS	FRAP
	IC ₅₀ (mg/mL)		
CMS	12,45 ± 0,27 ^a	5,76 ± 0,30 ^a	1,65 ± 0,01 ^b
CMC	8,12 ± 0,90 ^b	4,77 ± 0,06 ^b	2,06 ± 0,17 ^a
Ácido Cafeico	0,0072 ± 0,72 ^c	0,0055 ± 0,39 ^c	0,0009 ± 0,02 ^c

CMS: extrato de calos de café meio simples; CMC: extrato de calos de café meio composto; IC₅₀: concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical.

*Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre as amostras (p<0,05).

5.4 Estudos biológicos *in vitro* intracelular

5.4.1 Efeitos dos extratos de *C. canephora* sobre a viabilidade celular

Os efeitos dos extratos CMS e CMC na viabilidade das linhagens de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 foram avaliados por meio do método colorimétrico do MTT. Os resultados indicaram que, em diferentes concentrações, ambos os extratos não provocaram efeitos citotóxicos significativos em nenhuma das linhagens celulares, mesmo na concentração máxima testada de 1000 µg/mL, como ilustrado na Figura 1.

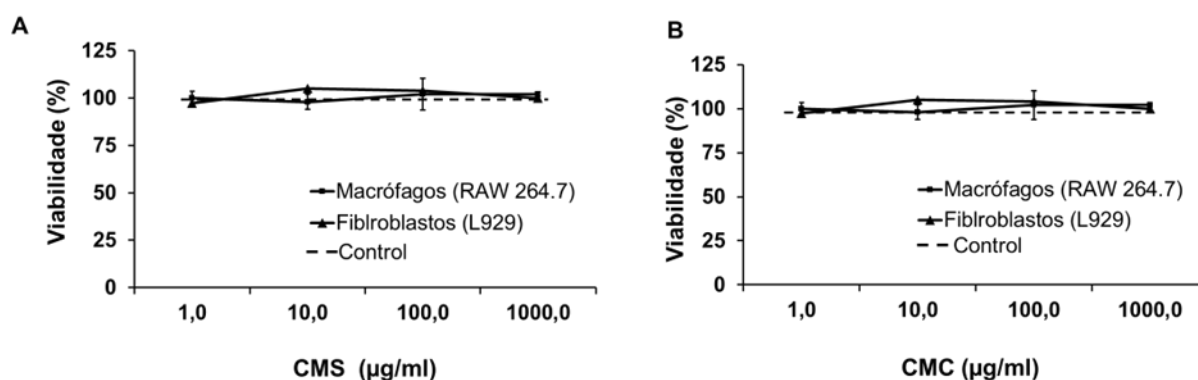


Figura 1. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) (A) e meio composto (CMC) (B) nas concentrações de 1 a 1000 µg/mL sobre a viabilidade de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem média ± D.P. de células viáveis comparada ao grupo controle de três experimentos independentes.

5.4.2 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

Os extratos de calos de *C. canephora* foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO (Figura 2). CMS na concentração de 1000 µg/mL

inibiu aproximadamente 46% da produção de nitrito comparada ao grupo LPS, enquanto para CMC houve diferença significativa nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, alcançando inibições na ordem de 52 e 57%, respectivamente, comparadas ao grupo controle LPS.

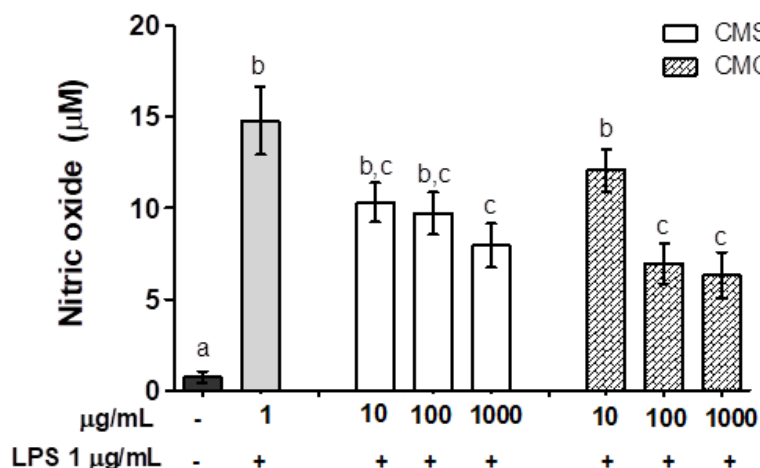


Figura. 2. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL sobre a concentração nitrito em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS 1 µg/mL (24 h). Os resultados foram expressos como média ± DP de dois experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5.4.3 Redução da produção do ânion superóxido *in vitro*

Os extratos de calos de *C. canephora* CMC e CMS também apresentaram efeito inibitório na produção do radical superóxido de forma dose dependente em cultura de macrófagos estimulados com LPS (Figure 3). Significativamente na concentração de 100 e 1000 µg/mL para CMC, enquanto para CMS houve inibição na concentração de 1000 µg/mL quando comparado ao grupo controle LPS (Figura 3).

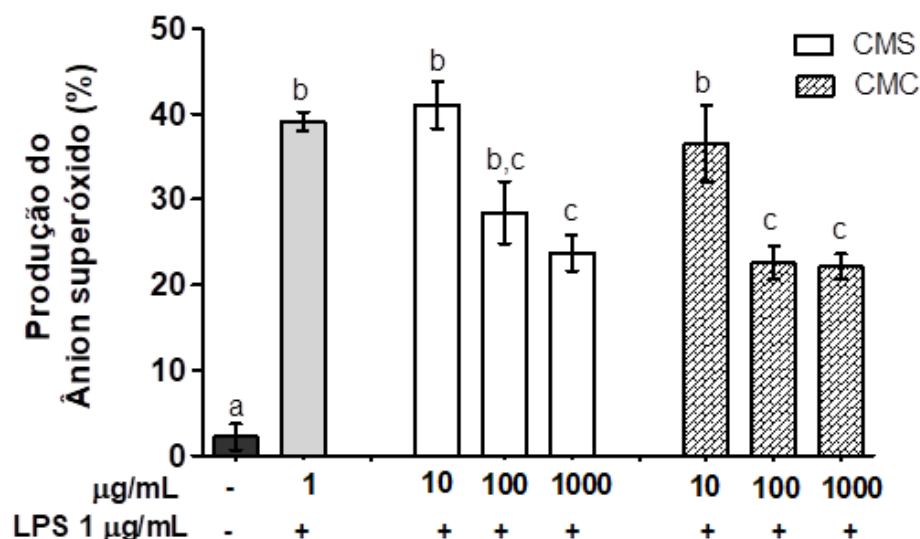


Figura 3. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL sobre a concentração do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24h de tratamento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5.4.4 Efeito preventivo contra danos oxidativos causados por H_2O_2 em fibroblastos

Tanto o extrato de CMS, quanto o de CMC apresentaram ação protetora quando comparado ao dano oxidativo causado pelo H_2O_2 isolado na concentração de 100 µg/mL e 1000 µg/mL em linhagem celular de fibroblastos do tipo L929 (Figura 4).

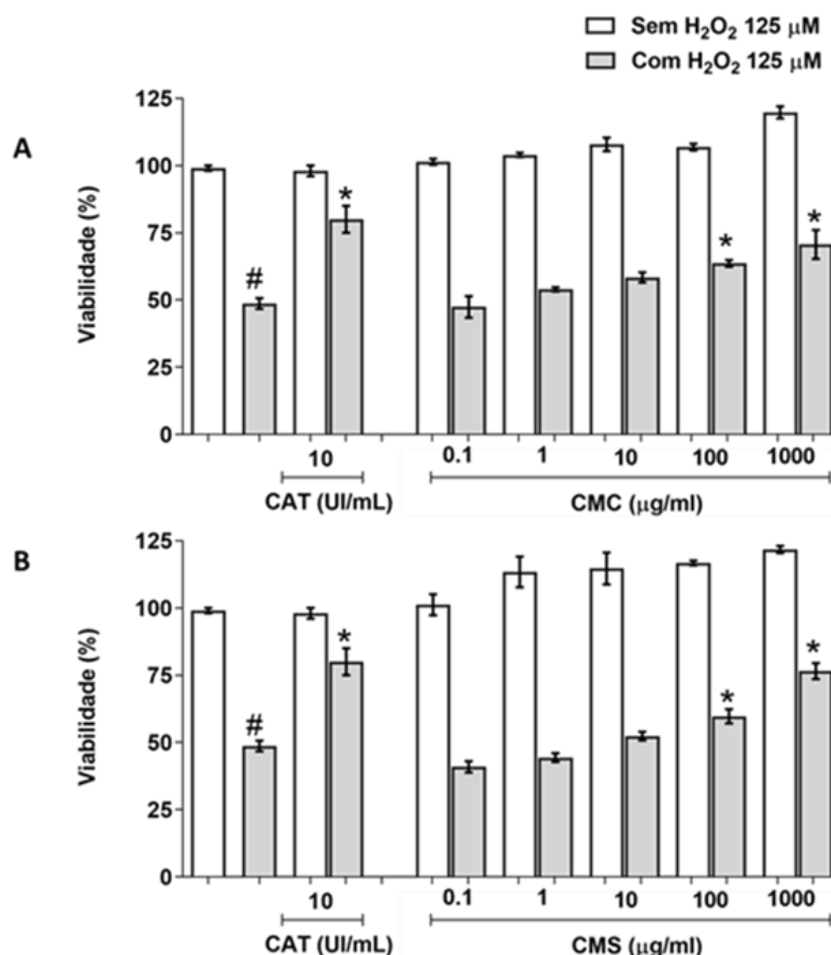


Figura 4. Efeito protetor extratos de calos de *C. canephora* meio composto (CMC) (A) e meio simples (CMS) (B) de *C. canephora* avaliados em fibroblastos L929 contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações de amostras na presença ou ausência de H₂O₂. A catalase a 10 UI/mL (CAT) foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 2). #Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle negativo sem H₂O₂. *Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle de H₂O₂ por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey post hoc.

5.4.5 Redução da produção de citocinas *in vitro*

Conforme observado na Figura 5, a exposição dos macrófagos ao LPS produziu um aumento significativo na produção de ambas as citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6. Quando as células foram expostas ao LPS em conjunto com o extrato CMS nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL observou-se um efeito inibitório significativo de 14, 31 e 48% na produção de TNF- α e de 5, 15 e 23% na produção de IL-6, respectivamente. O extrato CMC apresentou maior efeito inibitório na produção dessas citocinas inflamatórias, alcançando efeitos inibitórios de 67 e 34% para o TNF- α e a IL-6, respectivamente na concentração de 1000 µg/mL (Figura 5).

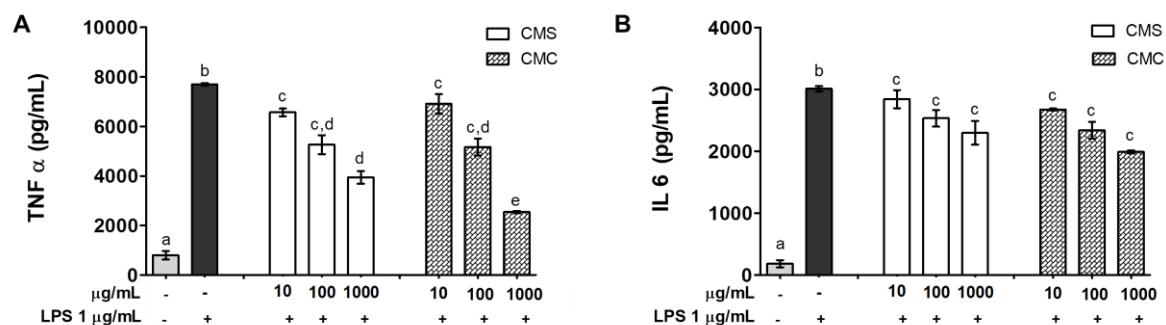


Figura 5. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B). Macrófagos RAW 264.7 foram expostos as concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de CMS e CMC na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5.4.6 Ensaio *in vitro* de cicatrização de feridas (*scratch assay*)

Para avaliar a migração celular *in vitro*, foi realizado o ensaio de "scratch assay" utilizando fibroblastos. Após 16 horas em cultura com diferentes concentrações de CMS e CMC, os resultados demonstraram um aumento positivo, dose dependente na migração dos fibroblastos na ferida artificial, especialmente na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de CMS e CMC, alcançando valores aproximados de 25% e 40%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Interessante destacar ainda que se observou um maior efeito para o extrato CMC em relação ao CMS. Os efeitos significativos de CMC na concentração de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram comparáveis ao PDGF (45%) utilizado como controle positivo (Figura 6).

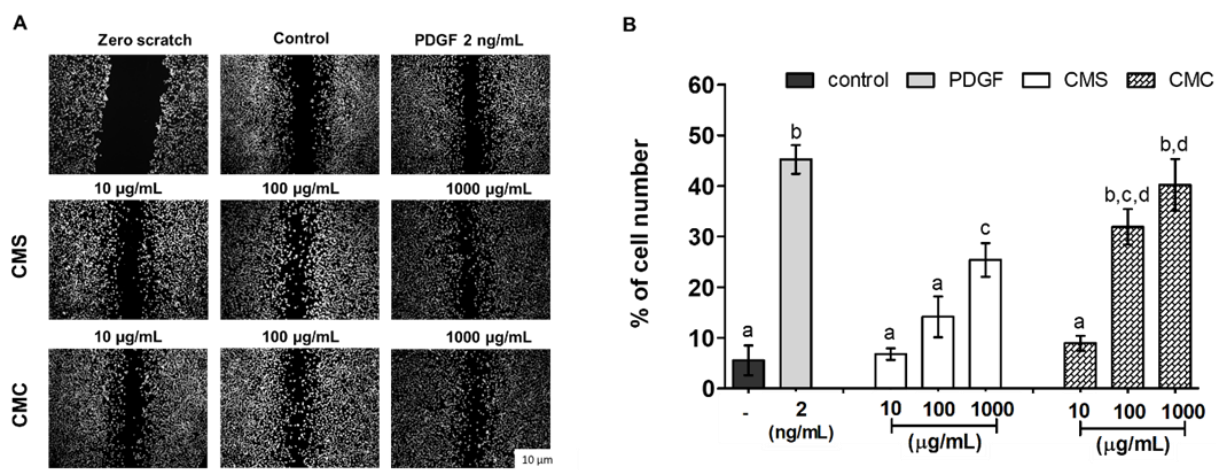


Figura 6. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* em meio simples (CMS) e meio composto (CMC) sobre a migração de fibroblastos no *scratch assay*. As células foram tratadas com 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos, 2 ng/mL de PDGF ou apenas com meio de cultura, como controle. (A) Imagens representativas foram tiradas imediatamente após a lesão (0 h) e após 16 h de incubação a 100 x. (B) Porcentagem do número de células após 16 h na área lesionada, em comparação com a área de lesão no momento zero (0 h). As barras representam a média $\pm$ DP de dois experimentos independentes. *Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos.

5.4.7 Proliferação de fibroblastos *in vitro* (BrdU)

As células tratadas com os extratos de calos de *C. canephora* mostraram um aumento significativo comparado ao controle para CMC e CMS na incorporação de BrdU no DNA, indicando efeito estimulador na proliferação de fibroblastos na concentração de 1000 µg/mL, no qual que foi medido pela densidade óptica da cultura em todas as concentrações testadas (Figura 7).

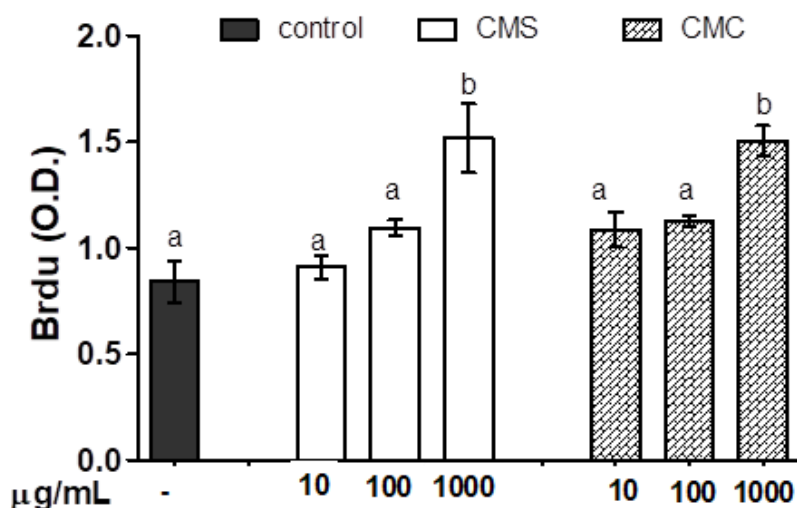


Figura 7. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* meio simples (CMS) e meio composto (CMC) de *C. canephora* na proliferação de fibroblastos. As células foram tratadas com 10, 100 e 1000 µg/mL dos extratos. Os resultados foram expressos como média ± DP de dois experimentos independentes. *Letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos.

6. DISCUSSÃO

A utilização de culturas de tecidos vegetais possibilita a obtenção de substâncias biologicamente ativas para a saúde humana (GUERRIERO et al., 2018). Essas substâncias, conhecidas como metabólitos primários e secundários, são caracterizadas pela ampla diversidade química, que podem apresentar inúmeras propriedades com aplicações industriais e medicinais (LATTANZIO, 2013; MOSAVAT et al., 2019; TIJJANI et al., 2020).

Dentre os diversos grupos de metabólitos existentes, merecem destaque os compostos fenólicos, os quais são sintetizados em praticamente todas as células vegetais, apresentando atividade antioxidante substancial. Segundo Aryal et al. (2019), eles são capazes de estabilizar a ação de radicais livres, protegendo assim não apenas as células vegetais, mas também as células humanas da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, esses metabólitos vegetais são

caracterizados por uma variedade de atividades farmacológicas, tais como fortalecimento capilar, antimicrobiano, anticancerígeno e cardioprotetor (ULLAH et al., 2020; DI LORENZO et al., 2021). Tudo isso desperta grande interesse na produção biotecnológica, inclusive utilizando a culturas de tecidos vegetais (CHEYNIER et al., 2013; HASANUZZAMAN et al., 2020).

Os efeitos benéficos do café podem ser mediados por vários mecanismos, como a indução da autofagia, melhorando a sensibilidade à insulina, estimulando a captação de glicose, retardando a progressão da sarcopenia e promovendo a regeneração do músculo lesionado (NAYLOR-DIRKS, 2015), e vias, como o AMP- a via da proteína quinase ativada (AMPK) para controle metabólico (SANTOS; LIMA, 2016), e a via Nrf2/elemento regulador antioxidante (ARE) para a resposta ao estresse oxidativo (BUTT;SULTAN, 2011). Além disso, as propriedades antiangiogênicas e anti-inflamatórias do café podem ser parcialmente mediadas pela inibição da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da secreção da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2011). Os efeitos biológicos do café são em parte atribuídos a compostos biologicamente ativos, como cafeína, terpenos, ácido clorogênico e melanoidinas, embora suas quantidades variem dependendo da espécie de café, grau de torrefação, método de preparo e tamanho da porção (GODOS et al., 2014).

Nos últimos anos, as pesquisas com extratos vegetais vêm recebendo destaque por suas propriedades biológicas. Seus compostos naturais estão ganhando enorme atenção nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, sendo considerados produtos economicamente valiosos (RAHMAN et al., 2021; ABDULHAFIZ et al., 2022). Aliado ao potencial biotecnológico, estes extratos obtidos a partir de células-tronco vegetais podem ser incorporados em formulações tópicas e também em suplementos alimentícios, uma vez que há em sua composição riqueza de metabólitos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e regenerativas (MIASKOWSKA; SIKORA, 2018).

Ao se tratar de metabólitos primários, o teor de proteínas foi avaliado pela primeira vez em extratos de calos de *C. canephora*, confirmando a presença de uma quantidade significativa de proteínas em ambos os extratos. Este fato, indica também a presença de aminoácidos em ambos os extratos, que podem apresentar propriedades benéficas a saúde humana, pois são capazes de promover a cicatrização de feridas e reparar a pele danificada, de modo a protegê-la contra danos do ambiente (SOLANO, 2020).

Explantos de folhas de *C. canephora* foram submetidos ao cultivo em dois tipos de meios de cultura. Para cada meio de cultivo realizou-se a combinação de diferentes reguladores de crescimento vegetal (auxinas e citocinas) para a indução e proliferação dos calos. De acordo com os resultados obtidos, os extratos de CMC exibiram quantidades significativamente maior de compostos fenólicos comparadas aos extratos de CMS. Este fato evidencia que a composição inerente ao tipo de meio de cultura e seus componentes suplementares o qual o calo é cultivado influencia em sua composição química conferindo-lhe características farmacológicas únicas. Em adição, os elementos do meio de cultura comportam-se como agentes similares a elicitores, uma vez que seus componentes induzem uma maior síntese de compostos fenólicos. Neste sentido, Bartos (2012), verificou que a concentração de sacarose influenciou diretamente na indução e desenvolvimento dos calos de *C. arabica*, visto que, a presença de uma fonte de carbono no meio de cultura é essencial para o crescimento vegetal, já que *in vitro* a fotossíntese do explante é limitada.

No meio de cultivo utilizado para obtenção do CMC, foi utilizado hormônios sintéticos tais como, 2,4-D e BAP e outros nutrientes, enquanto no meio que foi obtido o CMS foi empregado apenas o agente 2,4-D e componentes que o MS meio contém. Sendo assim, a combinação de 2,4-D (auxina), BAP (citocinina) e demais nutrientes suplementados no meio de cultura, potencializou o aumento da produção de metabólitos secundários em CMC comparado aos extratos de CMS.

A presença de compostos fenólicos nos extratos de calos de café, reforça sua capacidade antioxidante, corroborando com Lemos, et al. (2020) e Pinheiro, et al. (2021). Por conseguinte, um estudo realizado por Wongsu et al. (2019), demonstrou que o teor de fenólicos totais em extratos aquosos de grãos de *C. canephora* torrado foi de 27,2 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de amostra, valor inferior ao presente em CMS deste estudo ($32,48 \pm 2,32$) e CMC ($61,74 \pm 1,94$ mg EAC/100 g), que se destaca por apresentar um conteúdo superior de compostos fenólicos. Outro estudo feito com folhas de *Bauhinia vahlii* com extrato metanólico, constatou para fenólicos totais 48,7 mg de GAE/100 g, enquanto para extrato aquoso quente, 23,7 mg de GAE/100 g (KANDHASAMY; KANG, 2012), mostrando novamente que CMC contém altas quantidades de compostos fenólicos quando comparados com dados da literatura. Em adição, amostras de caule e folha de extratos aquosos de calos em meio suplementado com auxinas de *Lavandula coronopifolia* pesquisados por Sharifzadeh et al. (2023), apresentaram quantidades próximas ($64,73 \pm 9,93$ mg GAE/ 100g) comparativamente ao CMC. Rodríguez-Hernandez et al. (2018), investigaram o teor

total de fenólicos em extratos de células-tronco vegetais de *Olea europaea*, onde os polifenóis totais foram 20,8 mg EAC/100 g, demonstrando novamente que os extratos CMC e CMS apresentaram um conteúdo significativo de fenólicos com base nos relatados na literatura.

O teor de flavonoides totais não apresentou diferença entre os diferentes meios de cultivo empregado para obtenção dos extratos CMS e CMC. No entanto, os valores de flavonoides encontrados neste estudo foram superiores aos descritos por Guidoni et al. (2023), que encontrou um total inferior de flavonoides em suspensões celulares *C. canephora*.

O extrato CMC demonstrou maior atividade antioxidante, com valores de IC₅₀ significativamente inferiores em comparação com o extrato CMS, tanto para os radicais DPPH quanto para ABTS. Em consonância com um estudo anterior conduzido por Krishnan; Ahmad; Mahmood (2015), em que houve altas correlações entre DPPH com compostos fenólicos totais e flavonoides observadas em calos de *Gynura procumbens*. Achados semelhantes também foram demonstrados por Kapoor et al. (2018), onde o teor de compostos fenólicos foi significativamente correlacionado com a capacidade de eliminação do radical DPPH em calos de *Rhodiola imbricata* e calos de *Pouteria bullata* (ZAMAN et al., 2020).

Lemos et al. (2022), investigou a atividade antioxidante do extrato etanólico de grãos verdes de nove genótipos de café conilon com diferentes graus de maturação. Nessas amostras o IC₅₀ da capacidade redutora no método FRAP variou de 19,9 a 150 µg/mL, DPPH 10,8 a 438 µg/mL e ABTS 31,7 a 355 µg/mL. Desta forma, CMC apresentou resultados superiores para DPPH (8,12 ± 0,90), ABTS (4,77 ± 0,06) e FRAP (2,06 ± 0,17), exibindo menores valores de IC₅₀, enquanto CMS, apenas para ABTS (5,76 ± 0,30) e FRAP (1,65 ± 0,01). Estes resultados demonstram um alto potencial antioxidante nos extratos de calos de *C. canephora*. Em adição, Guidoni et al. (2023), também avaliou extratos aquosos de células-tronco de *C. canephora*, porém, em suspensões celulares, em que o valor encontrado para ABTS foi 58,15 ± 12,4 e FRAP 6,32 ± 0,21, evidenciando que extratos CMC e CMS tem atividade antioxidante superior aos encontrados em suspensões celulares de *C. capenhora*.

A produção de radicais livres, como o NO e o O₂⁻ constitui-se de um processo contínuo e fisiológico, mas em excesso podem comprometer as funções celulares (MAN et al., 2022). Eles participam de inúmeros processos metabólicos contribuindo com os mecanismos de defesa do organismo. Contudo, de acordo com Barbosa et al. (2010), a produção excessiva leva à oxidação de biomoléculas com consequente

perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo contra células e tecidos. O desequilíbrio entre esses radicais é considerado um fator importante no processo de envelhecimento, visto que, é responsável pela disfunção mitocondrial, apoptose celular e outras alterações patológicas do envelhecimento (AFANAS'EV, 2009). Além do desencadeamento de diferentes eventos patológicos como a inflamação, que por sua vez, está envolvida nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos. No processo inflamatório, células são ativadas, dentre elas o macrófago (KORAC, et al., 2021). Essas células produzem mediadores inflamatórios, sendo alguns deles o óxido nítrico, ânion superóxido, fatores de transcrição, e citocinas (ARULSELVAN et al., 2016).

Analisando a atividade dos extratos, ambos suprimiram a produção de óxido nítrico (NO) e do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), em células de macrófagos RAW 264.7. Os resultados do presente estudo indicam uma importante atividade biológica dos extratos de calos de *C. canephora* na redução da produção de NO e $O_2^{\cdot-}$ *in vitro*. Destacando-se o extrato CMC, que foi capaz de inibir significativamente NO e $O_2^{\cdot-}$ na concentração de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o extrato de CMS apenas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Similarmente, Guidoni et al. (2022), trabalhando com extratos de células-tronco em suspensão de *C. canephora* também observou uma redução significativa na produção de NO e superóxido.

Entretanto, quando comparado a um estudo desenvolvido por Lemos et al. (2022), em que apenas 6 de 27 extratos etanólicos de grãos *ex vitro* *C. canephora* foram capazes de inibir a produção de NO a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, onde a inibição variou de 13,3% a 26,9%. Os extratos CMC e CMS se destacam, com capacidade inibitória de NO superior aos extratos etanólicos de grãos verdes de café conilon, pois em uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, ambos os extratos de calos de café apresentaram supressão de NO com 30% de inibição para CMS e 18% para CMC.

Compostos capazes de sequestrar EROs, como o radical NO, podem desempenhar uma função citoprotetora, agindo em processos de citotoxicidade induzida por EROs, atuando na modulação de processos inflamatórios, diminuindo o estresse oxidativo (MAIA et al, 2010). Testando a atividade antioxidante pelo peróxido de hidrogênio, houve um efeito protetor quanto ao dano oxidativo causado nas células pelos dois extratos de calos de café (CMC e CMS) nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A respeito da capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, Rodrigues; Salva; Bragagnolo (2015), demonstraram que diferentes genótipos de *C.*

canephora assim como nesse estudo, foram capazes de sequestrar o peróxido de hidrogênio.

Neste estudo, também foi demonstrado que a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, que são consideradas cruciais nos estágios iniciais e no desenvolvimento da inflamação, foram significativamente suprimidas pelos extratos de calos de *C. canephora*, sugerindo um potencial atividade anti-inflamatória. Essas citocinas quando associadas ao estresse oxidativo contribuem para o ciclo da resposta inflamatória, de modo a intensificar a degradação da matriz extracelular e a transdução de sinalização pró-inflamatória (LI et al., 2012).

Logo, compostos que podem interferir na atividade do TNF- α e IL-6 no estresse oxidativo desempenham um papel importante na manutenção da homeostase celular e tecidual. A resposta inflamatória é considerada uma etapa importante do processo de cicatrização de feridas, pois prepara o ambiente da ferida para o processo de reparação. No entanto, uma resposta inflamatória excessiva pode atrasar a cicatrização de feridas (ARAÚJO et al., 2010; EUBANK; MARSH, 2010).

O efeito inibitório na produção de TNF- α e IL-6 corroboram com os achados de Lemos et al. (2022), onde os extratos de diferentes genótipos de *C. canephora*, também apresentaram inibição destas citocinas. Guidoni et al. (2022), também demonstrou que o extrato de células-tronco de *C. canephora* em suspensão celular reduziu a produção de TNF- α e IL-6. Os resultados apresentados sugerem que extratos de calos de café CMC e CMS modulam a resposta inflamatória, possivelmente por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α no local da ferida, podendo, portanto, controlar o grau e a duração da resposta inflamatória contribuindo para o fechamento bem-sucedido da ferida (EUBANK; MARSH, 2010; BEHM et al., 2011; GUIDONI et al., 2022).

Extratos de células-tronco vegetais estão sendo cada vez mais utilizados para formulação de produtos tópicos, devido seus potenciais efeitos antirrugas e antienvelhecimento comprovados na literatura (SANZ et al., 2016). A presença de moléculas complexas biologicamente ativas, em extratos de células-tronco vegetais demonstram efeitos satisfatórios na prevenção do envelhecimento da pele (ARGYROPOULOU et al., 2013). Um estudo com extrato de células-tronco de tomate comprovou sua capacidade em preservar a integridade do DNA frente aos danos causados por metais pesados e neutralizar a degradação do colágeno (TITO et al., 2011). Em adição, Guidoni et al. (2022), analisou o extrato aquoso de células-tronco de *C. canephora* a partir de suspensões celulares, demonstrando que a formulação

lipossomal melhora o processo de cicatrização de ferida na pele, o que pode ser atribuído a regulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

No presente estudo, demonstrou-se que os extratos de calos de *C. canephora* contribuem de forma significativa para a proliferação e migração de fibroblastos. Os extratos CMC e CMS revelaram um potencial de proliferação celular no ensaio BrdU, a uma concentração de 1000 µg/mL, corroborando com as descobertas de Guidoni et al. (2023). Por outro lado, no ensaio do scratch assay, que avalia não apenas a proliferação, mas também a migração celular, tanto o CMS quanto o CMC exibiram efeitos significativos. Esses dados demonstram que os extratos de calos de café podem representar uma estratégia promissora para estimular os fibroblastos, contribuindo para a regeneração tecidual e a integridade de uma pele saudável. Estes dados corroboram com o estudo de Bimonte et al. (2011), com extratos de células-tronco da espécie *Coffea bengalensis*, que foi capaz de induzir a síntese de colágeno em fibroblastos em cultura e apresentou efeitos antirrugas. Em adição, o extrato de células-tronco a partir de suspensão celular de *C. canephora*, foi capaz de contribuir significativamente para a proliferação e migração de fibroblastos (Guidoni et al., 2023). Assim, os resultados obtidos neste estudo com CMC e CMS, mostram-se promissores na busca por novas fontes naturais de matéria prima a serem utilizadas na indústria cosmética e/ou farmacêutica.

Como evidenciado por este estudo, o extrato aquoso derivado de calos de *C. canephora* apresenta compostos bioativos com propriedades terapêuticas benéficas e promissoras. Estes compostos demonstram potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante, entre outros, o que os torna candidatos ideais para serem incorporados em formulações de medicamentos e produtos cosméticos. Esse enfoque é particularmente relevante, dado que nos últimos anos, as fontes de recursos naturais têm desempenhado um papel fundamental, sendo responsáveis por mais de 80% de toda a produção industrial global (EIBL, 2018).

Nesse contexto, a sugestão de criar um produto a partir de extratos de calos de *C. canephora* emerge como uma alternativa inovadora e promissora para aplicações terapêuticas voltadas ao reparo e regeneração de tecidos. É importante salientar que os resultados obtidos revelam um desempenho ainda mais satisfatório em comparação com os achados anteriores referentes ao extrato de suspensão celular de *C. canephora*, conforme documentado por Guidoni et al. (2022). Isso ressalta o potencial significativo desses extratos na promoção da saúde tecidual.

7. CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo destacam os notáveis efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e estimulatórios sobre a proliferação e migração de fibroblastos nos extratos CMC e CMS de *C. canephora*. A observação de uma resposta mais promissora nos ensaios antioxidantes, anti-inflamatórios e proliferativos com o extrato CMC enfatiza seu potencial superior na geração de compostos bioativos.

Estes achados não somente corroboram a relevância do cultivo de calos de café para a produção de metabólitos secundários, mas também apontam para uma direção promissora no desenvolvimento de produtos inovadores. Nesse contexto, os extratos de calos de *C. canephora* revelam-se como uma fonte promissora de bioativos, oferecendo oportunidades consideráveis para a formulação de produtos cosméticos e terapêuticos.

À medida que adentramos uma era que valoriza cada vez mais soluções naturais e eficazes, a exploração desses extratos de calos de *C. canephora* surge como uma abordagem promissora. A continuidade dessa pesquisa poderá não apenas aprofundar nosso entendimento sobre as propriedades benéficas desses extratos, mas também abrir caminho para a criação de produtos que contribuam significativamente para a saúde e o bem-estar humano.

8. REFERÊNCIAS

- ABDULHAFIZ, F. et al. Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, 2022.
- ADETUTU, A.; MORGAN, W.A.; CORCORAN, O. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a woundhealing plant of Nigeria. **J Ethnopharmacol.**, v. 1, n. 133, p.116-119, 2011.
- AFANAS'EV, I. Superoxide and nitric oxide in senescence and aging. **Frontiers in Bioscience**, n. 14, p. 3899, 2009.
- AHMAD, N. et al; FAZAL,H.; ZAMIR, R.; KHALIL, S.A.; ABBASI, B.H. Callogenesis and Shoot Organogenesis from Flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech. **Nature.**, v. 13, p. 174–7, 2011.
- AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3782–3788, 2009.
- ANNAN, K.; HOUGHTON, P. J. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. **J Ethnopharmacol.**, v. 1, n. 119, p.141-144, 2008.
- ARAÚJO, L.U. et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, p. 460-466, 2010.
- ARGYROPOULOU, A. et al. Natural compounds with anti-ageing activity. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 11, p. 1412, 2013.
- ARULSELVAN, P. et al. Roleof Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, p. 15 ,2016.
- ARYAL, S. et al. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. **Plants**, v. 8, p. 96, 2019.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse Oxidativo: avaliação de marcadores. **Rev. Nutr.**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARTOS, M. C. P. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização química e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Distrito Federal, p. 1- 57, 2012.

- BEHM, B. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, p. 812-820, 2011.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BESSADA, S. M. F.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Coffee Silverskin: A Review on Potential Cosmetic Applications. **Cosmetics**, v.5, p. 5, 2018.
- BIMONTE, M. et al. *Coffea bengalensis* for antiwrinkle and skin toning applications. **Cosmetics and toiletries**, v. 126, p. 644–650, 2011.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.
- BÖTTGER, A. et al. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. In: Learning Materials in Biosciences. **Springer International Publishing**, 2018. p. 143–152.
- BRAVO, J. et al. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. **Food Research International**, v. 50, p. 610-616, 2013.
- BUTT, M.S.; SULTAN, M.T. Coffee and its consumption: Benefits and risks. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 51, p. 363–373, 2011.
- CAI, Z. et al. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 108, p. 401-409, 2012.
- CÁRDENAS, C.; QUESADA, A.R.; MEDINA, M.A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. **PLoS ONE**, v. 6. , 2011.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. DE; CARDOSO, F. DE C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, 2019.
- CASTALDO, L. et al. Study of the Chemical Components, Bioactivity and Antifungal Properties of the Coffee Husk. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 4, p.43-54, 2018.
- CAUCANAS, M. et al. Dynamics of skin barrier repair following preconditioning by a biotechnology-driven extract from samphire (*Crithmum maritimum*) stem cells. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 10, n. 4, p. 288–293, 2011.

- CETIN, E.S. et al. The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures, **Biological Research**, v. 47, n. 47, p. 1-6, 2014.
- CETIN, E.S. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. **Biological Research**, v. 47, n. 37, p. 1-7, 2014.
- CHEYNIER, V. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiol Biochem**, v. 72, p. 1-20, 2013.
- CHOI, H. W.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 232, p. 1–10, 2016.
- COSTA, P. et al. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**. v. 135, n. 3, p. 1253-1260, 2012.
- DEBNATH, M.; MALIK, C.P.; BISEN, P.S. Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-Based Medicines. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 7, p. 33–49, 2006.
- DEEPTHI, S.; SATHEESHKUMAR, K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 124, n. 1, p. 483– 493. 2016.
- DI LORENZO, C. et al. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. **Nutrients**, v. 13, p. 273, 2021.
- DIRKS-NAYLOR, A.J. The benefits of coffee on skeletal muscle. **Life Sci.**, v.143, p. 182–186, 2015.
- DOS SANTOS GRAMMA, L.S. et al. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, p. 319–327, 2016.
- EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50–59, 2019.
- EIBL, R. et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 8661-8675, 2018.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

- ESQUIVEL-ALVARADO, D. et al. Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical *Vaccinium* Species from Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2872–2879, 2020.
- EUBANK, T.D.; MARSH, C.B. Cytokines and growth factors in the regulation of wound inflammation. **Adv. Wound Care.**, v. 1, p. 211-216, 2010.
- Exportações dos Cafés do Brasil somam 44,5 milhões de sacas em 2020 e batem recorde histórico. **Consórcio Pesquisa Café**, 2021. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/1038-2021-01-22-18-07-27>>. Acesso em: 22/04/2022.
- FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 536, p. 1–11, 2019.
- FERRÃO, R. G. et al. **Café Conilon**. 2. ed. Vitória, ES: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural Rua, 2017.
- FOGLIO, M.A et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **Mult Rev Interd UNICAMP**. UNICAMP, 2006.
- FRONZA, M. et al. The scratch assay: A suitable *in vitro* tool for studying wound healing effects. **Planta Medica**, v. 74, n. 09, jul. 2008.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**. v. 50, n. 1, p.151–158, 1968.
- GEDIYA, S. K. et al. **Herbal Plants : Used as a cosmetics**. v. 1, p. 24–32, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 2 in practice. 2 ed. Edington: Exegetis, p.1361, 1996.
- GODOS, J. et al. Coffee components and cardiovascular risk: Beneficial and detrimental effects. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 65, p. 925–936, 2014.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnol Adv.**, v. 31, p. 166-74, 2013.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Culturas de tecidos e**

- transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CBAB, v.2., p.533-568., 1999.
- GUERRIERO, G. et al. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. **Genes**, v. 9, p. 1-22 ,2018.
- GUIDONI, M. et al. Liposomal stem cell extract formulation from *Coffea canephora* shows outstanding anti-inflammatory activity, increased tissue repair, neocollagenesis and neoangiogenesis. **Archives of Dermatological Research**, p. 1–23, 2022.
- GUIDONI, M. et al. Plant stem cell extract from *Coffea canephora* shows antioxidant, anti-inflammatory, and skin regenerative properties mediated by suppression of nuclear factor-kB. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 1–10, 2023.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. **Antioxidants**, v. 9, p. 681, 2020.
- HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160,2015.
- ISAH, T. et al. Secondary Metabolism of Pharmaceuticals in the Plant *in vitro* Cultures: Strategies, Approaches, and Limitations to Achieving Higher Yield. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 132, p. 239–265, 2018.
- JUNG, S. et al. Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 6, p. 626–635, 2017.
- KABERA, J. N. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 377–392,2014.
- KANDHASAMY, S. ; KANG, S. C. Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 319-325, 2012.
- KAPOOR, S. et al. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 258-265, 2018.
- KITAGAWA, S. et al. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. **Chemical and**

- Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 6, p. 793–796, 2011.
- KORAC, B. et al. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Redox Biology**, v. 42, 2021.
- KREPSKY, P. B. et al. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, v. 19, n. 11, p. 953–957, 2012.
- KRISHNAN, V.; AHMAD, S.; MAHMOOD, M. Antioxidant Potential in Different Parts and Callus of *Gynura procumbens* and Different Parts of *Gynura bicolor*. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 7, 2015.
- LATTANZIO, V. Phenolic Compounds: Introduction. **Natural Products**, p. 1543-1580, 2013.
- LEMOS, M. F. et al. Chlorogenic acid and caffeine contents and anti-inflammatory and antioxidant activities of green beans of conilon and *arabica* coffees harvested with different degrees of maturation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 101467, 2022.
- LI, J. et al. TNF- α Inhibitors with Anti-Oxidative Stress Activity from Natural Products. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1408– 1421, 2012.
- LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479–496, 2010.
- LORENÇONI, M. F. et al. Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 39, 2021.
- MAIA, R. M., et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum*. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20, n. 4, p. 489-493, 2010.
- MAN, M.-Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p. 949–964, 2022.
- MATTHEW, R., SANKAR, P. D. Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 6, 2014.
- MAYERNI, R. et al. Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 583, 2020.
- MIASKOWSKA, M.; SIKORA, E. Anti-aging properties of plant stem cell extracts. **Cosmetics**, v. 5, n. 4, 2018.

- MORAIS, T.P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.14, n.1, p.110- 121, 2012.
- MOSAVAT, N. et al. Modulation of callus growth and secondary metabolites in different *Thymus* species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, p. 316-322, 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473– 497, 1966.
- NAYLOR-DIRKS, A. J. The benefits of coffee on skeletal muscle. **Life Sciences**, v. 145, p. 182-186, 2015.
- NIGRA, A. D. et al. Antitumor Effects of Freeze-Dried Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Extracts on Breast Cancer Cell Lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–16, 2021.
- PERASSOLO, M. et al. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*. **Industrial Crops & Products**, v. 105, p. 124-132, 2017.
- PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.
- PINHEIRO, F. DE A. et al. *Arabica* and *Conilon* coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. **Food Chemistry**, v. 336, p. 127701, 2021.
- RAHMAN, M. M. et al. Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 233, 2021.
- RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems. **Food Chemistry**, v. 115, p. 79-85, 2009.
- RAMIREZ-ESTRADA, K. et al. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. **Molecules**, v. 21, p. 182, 2016.

- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REBOLLO-HERNANZ, M. et al. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, 2019.
- REZENDE, J. C. DE et al. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. Acta Scientiarum. **Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 93–98, 2012.
- RODRIGUES, N. P.; SALVA, T. D. J. G.; BRAGAGNOLO, N. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the *in vitro* Capacity To Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4815–4826, 2015.
- RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, L. et al. Fatty Acid Profile, Phenolics and Flavonoids Contents in *Olea europaea* L. Callus Culture cv. *cornicabra*. **Journal of Oleo Science**, v. 67, p. 525–529, 2018.
- SANTOS, R.M.; LIMA, D.R. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: A mini-review. Eur. **J. Nutr.**, v. 55, p. 1345–1358, 2016.
- SANZ, M. T. et al. Biorevitalizing effect of a novel facial serum containing apple stem cell extract, pro-collagen lipopeptide, creatine, and urea on skin aging signs. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p. 24–30, 2016.
- SARKATE, A. et al. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 130, p. 641-649, 2017.
- SCHERER, M. M. DE C. **Atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* dos monorpenos beta-citronelol, alfa-felandreno, terpinoleno e sabieno.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Vila Velha, Espírito Santo, p. 1 – 8, 2017.
- SHAABAN, H.; MOSTAFA, A. Sustainable Eco-Friendly Ultra-High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Caffeine and Theobromine in Commercial Teas: Evaluation of Greenness Profile Using NEMI and Eco-Scale Assessment Tools. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 101, n. 6, p. 1781–1787, 2018.

- SHARIFZADEH, S. et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Lavandula coronopifolia* Poir Extracts: A Comparison between Callus Culture and Native Plant. **Journal of Food Biochemistry**, v. 2023, p. 10, 2023.
- SOLANO, F. Metabolism and Functions of Amino Acids in the Skin. **Adv Exp Med Biol.**, v.1265, p.187-199, 2020.
- SOUZA, A. C. DE et al. Indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. CV. Catuaí amarelo. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.
- TIJJANI, H. et al. Polyphenols: Classifications, Biosynthesis and Bioactivities. **Functional Foods and Nutraceuticals**, p. 389-414, 2020.
- TITO, A. et al. A tomato stem cell extract, containing antioxidant compounds and metal chelating factors, protects skin cells from heavy metal-induced damages. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 6, p. 543–552, 2011.
- TORRES, A. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, p. 128, 2000.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 25, p. 5243, 2020.
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Funct.**, v. 5, n. 2, p. 189–197, 2014.
- VENIAL, L. R. et al. Autotetraploid *Coffea canephora* and Auto-Alloctaploid *Coffea arabica* From *In Vitro* Chromosome Set Doubling: New Germplasms for *Coffea*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 154, p. 1–12, 2020.
- VENTURIERI, G.A., VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazon**. FapUNIFESP., v. 34, p. 507–11, 2004.
- VITTORAZZI, C. et al. Antioxidant, antimicrobial and wound healing properties of *Struthanthus vulgaris*. **Pharm. Biol.**, v. 54, p. 331–337, 2016.
- WERNER, E.T. et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Bot Bras**. FapUNIFESP. v. 24, p. 1046–51, 2010.
- WONGSA, P. et al. Quality and bioactive compounds of blends of *Arabica* and *Robusta* spray-dried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, p. 579– 587, 2019.

- WU, S. et al. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 183, p. 824-833, 2016.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidante activities of legumes as affected by extration solvents. **Journal Food Science**, v. 72, p. 159-66, 2007. *Com modificações*
- YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762,2018.
- YAO, J. et al. **Plants as Factories for Human Pharmaceuticals : Applications and Challenges**. v. 2015, p. 28549–28565, 2015.
- ZAMAN, M. A. K.; et al. Induction, multiplication, and evaluation of antioxidant activity of polyalthia bullata callus, a woody medicinal plant. **Plants**, v. 9, p. 1-21, 2020.