

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

**EFEITO DOS ELICITORES ESPERMIDINA E METIL JASMONATO
NA CULTURA DE CALOS DE *Coffea canephora* SOBRE A
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
CICATRIZANTE**

MARIANA MAGALHÃES MARCHESI RIBEIRO CELESTINO

VILA VELHA
OUTUBRO/2023

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

**EFEITO DOS ELICITORES ESPERMIDINA E METIL JASMONATO
NA CULTURA DE CALOS DE *Coffea canephora* SOBRE A
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
CICATRIZANTE**

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

MARIANA MAGALHÃES MARCHESI RIBEIRO CELESTINO

VILA VELHA
OUTUBRO/2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C392e Celestino, Mariana Magalhães Marchesi Ribeiro.
Efeito dos elicitores espermidina e metil jasmonato na cultura de calos de *Coffea canephora* sobre a produção de metabólitos bioativos com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante / Mariana Magalhães Marchesi Ribeiro Celestino. – 2023.
51 f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.
Coorientador: Victor Paulo Mesquita de Aragão.
Dissertação (Biotecnologia vegetal) – Universidade Vila Velha 2023.
Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia vegetal. 2. Células – Tronco. 3. Fertilização in vitro.
4. Café I. Fronza, Marcio. II. Aragão, Victor Paulo Mesquita de.
III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 660.603

MARIANA MAGALHÃES MARCHESI RIBEIRO CELESTINO

EFEITO DOS ELICITORES ESPERMIDINA E METIL JASMONATO NA CULTURA DE CALOS DE *Coffea canephora* SOBRE A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE

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

Aprovada em 26 de outubro de 2023.

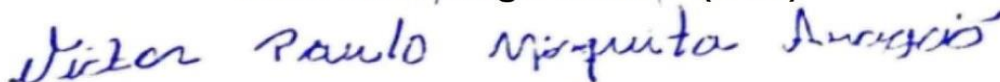
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Tatiana Santos Barroso (UFES)



Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)



**Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão (ICCA/UVV)
Co-orientador**



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

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela vida que Ele me concedeu repleta de desafios e vitórias. E em meio as provações, batalhas, aflições, me proporcionou esperança, perseverança quando escolhi ser vencedora durante toda a minha caminhada. Gratidão por ter me guiado até aqui com a tua graça, conselhos, amor incondicional, zelo e por sempre estar ao meu lado me dando a tua força para superar dias difíceis e alcançar as vitórias.

Ao meu esposo Vitor que acima de tudo é um grande amigo, meu maior incentivador nessa vida, agradeço pelas orações, amor, paciência e parceria em todos os momentos da minha caminhada e em mais uma jornada de sucesso concluída. Com você ao meu lado, tudo se torna leve e prazeroso! Dedico a você esta vitória. Te amo demais, Tudão!

Aos meus amados pais Rosalva e Celso, agradeço pelo amor, carinho, incentivo e orações em toda a minha vida, me ajudando a alcançar mais uma vitória. Obrigada por tudo! Amo muito vocês, pois Deus me deu os melhores pais que eu poderia ter!

A minha irmã e amiga Lidiane que sempre me aconselhou e apoiou na realização do mestrado. Obrigada pelas orações, por compartilhar tantos momentos juntas e ser uma pessoa e profissional admirável e incentivadora. Ao meu cunhado Rodrigo, gratidão pela torcida e ajuda quando sempre precisava.

Aos meus sogros e cunhados por todas as orações e carinho!

Aos irmãos da minha igreja por tantas orações levadas aos céus.

Agradeço especialmente ao meu Orientador Dr Marcio Fronza pelo acolhimento, confiança depositada em mim desde o início deste projeto, disponibilidade para orientar com sua vasta experiência e direção assertiva nos experimentos e por me orientar de uma maneira tão leve, incentivadora, pautada pela sua excelência como profissional e ser humano diferenciado que encanta a todos. Você é inspirador!

Em especial também ao meu Coorientador Dr Victor Aragão, pela confiança, disponibilidade no ensino, conselhos, pelos momentos de risadas, amizade construída e por ser diferenciado em tudo que faz, me ajudando a tornar este trabalho uma válida e agradável experiência de aprendizado com uma coorientação exemplar.

Portanto, a vocês doutores, Márcio e Victor, gratidão por terem contribuído com tanto em minha formação acadêmica de uma forma tão especial que levarei para a vida! Vocês são incríveis e são presentes de Deus em minha vida!

Aos avaliadores da banca, Dr. Rodrigo Scherer e Dra Tatiana Santos, por suas consideráveis e valiosas contribuições no iniciar e findar desta pesquisa.

E nesta trajetória permeada por inúmeros desafios, alegrias e muitos percalços pelo caminho, houve contribuição também de várias outras pessoas, indispensáveis em cada momento da caminhada. Trilhar este caminho foi árduo, mas possível com o apoio e energia dos colegas nos experimentos do Laboratório de Cultura de Células a quem sou grata: Antônio Domingos, Iana Pessoa, Luana Nogueira, Tamires Cruz, Júlia Sales, Moisés Caús, Kariane Sousa e Gabriela Simões. Obrigada pela agradável convivência durante o dia-a-dia no laboratório e nos momentos de pausa para aquele bom café (conilon) com prosa.

À Marcela Gonçalves, minha IC, maravilhosa, ajudadora, paciente. Sua parceria foi essencial e levarei para a vida. Obrigada por tudo!

A amiga especial que o mestrado me proporcionou, Débora Santana, que desde o início me ajudou, apoiou e incentivou nesta caminhada de sucesso. Sua amizade é um presente em minha vida!

Aos amigos Wedson Correa e Márcia Sales, pela amizade, incentivo na escolha do programa e da orientação/coorientação. Sempre recordarei com muito carinho. Gratidão!

Agradeço aos funcionários da UVV, especialmente ao Edson Rodrigues da secretaria da pós de scrito sensu que dispensou toda atenção ao falar sobre o curso de uma forma encantadora. À dona Zenaide por tanto carinho e palavras de incentivo ao iniciar cedinho mais um dia de labuta. À UVV/UENF, ao meu Programa de Biotecnologia Vegetal e a todos os professores do curso pela qualidade do ensino, especialmente ao Dr Alessandro Coutinho por ser tão humano, sábio, diferenciado e inspirador.

Por fim, o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectualmente.

Muito Obrigada!
Mariana Marchesi

“A oração vai aonde eu não posso ir. Deus prometeu me socorrer quando eu pedir. A oração dos que amam a Deus pode muito em seu poder e quando estou em oração tudo pode acontecer”

“Aquele que é poderoso para fazer tudo mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera”. Efésios 3:20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Cultura de células-tronco vegetais: cultivo <i>in vitro</i> de calos	14
1.2. <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner.....	15
1.3. Elictores no cultivo <i>in vitro</i>	16
1.4. Atividade antioxidante e anti-inflamatória.....	18
1.5. Cicatrização.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. METODOLOGIA	22
3.1. Material vegetal	22
3.2. Desinfestação do material vegetal.....	22
3.3. Indução de calos	23
3.4. Elicitação com Metil jasmonato e Espermidina.....	23
3.5. Obtenção dos extratos vegetais	24
3.6. Quantificação de proteínas.....	24
3.7. Quantificação de polifenóis totais	24
3.8. Quantificação de flavonoides	24
3.9. Ensaio químico de atividade antioxidante	25
3.10. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	25
3.11. Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	25
3.12. Redução da produção do ânion superóxido	26
3.13. Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	26
3.14. Estudo do efeito dos extratos sobre a proliferação celular - BrdU	27
3.15. Efeito dos extratos na migração de fibroblastos - <i>Scratch assay</i>	27

3.16. Análise estatística dos dados	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Obtenção dos extratos de calos de <i>C.canephora</i>	28
4.2. Teor de proteínas nos extratos de calos de <i>C.canephora</i>	28
4.3. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides	29
4.4. Atividade antioxidante dos extratos de calos de <i>C.canephora</i>	29
4.5. Efeitos dos extratos de calos de <i>C.canephora</i> sobre a viabilidade de fibroblastos e macrófagos.....	30
4.6. Redução da produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	31
4.7. Redução da produção do ânion superóxido <i>in vitro</i>	32
4.8. Redução da produção de citocinas <i>in vitro</i>	33
4.9. Proliferação de fibroblastos <i>in vitro</i> - BrdU	34
4.10. Efeitos dos extratos na migração celular <i>in vitro</i>	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES.....	41
7. AGRADECIMENTOS	42
8. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de proteínas totais nos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ. μM28

Tabela 2. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides nos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ. μM29

Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ.....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a viabilidade de fibroblastos L929 (A) e macrófagos RAW 264.7 (B). As células foram expostas por 24h aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μ M de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μ g/mL. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm DP de células viáveis, comparada ao grupo controle, de três experimentos independentes (n=3).....31

Figura 2. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS 1 μ g/mL. As células foram expostas por 24h aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com com 100 e 200 μ M de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10 e 100 μ g/mL. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes (n=2). Significância estatística ($p < 0,05$). * grupo tratado comparado ao controle LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.....32

Figura 3. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a concentração do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) após 24 h de tratamento.. As células foram expostas aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com com 100 e 200 μ M de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10 e 100 μ g/mL. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes (n=2). Significância estatística ($p < 0,05$). *grupo tratado comparado ao controle LPS por via unidirecional ANOVA seguida de teste post hoc de Tukey.....33

Figura 4. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) na inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF α (A) e IL-6 (B). Os extratos sem elicitor (controle) e elicitados com com 100 e 200 μ M de Spd e MJ foram testados nas concentrações de 1, 10 e 100 μ g/mL em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL). Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes (n=2). *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com células induzidas por LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.....34

Figura 5. Efeito dos ECCC na proliferação de fibroblastos. As células foram expostas aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ foram testados nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes (n=2). *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle basal por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.....35

Figura 6. Efeito dos ECCC na migração de fibroblastos no *scratch assay*. **A)** Porcentagem do número total de células presentes na ferida artificial após 16 h de incubação (37 °C a 5% CO_2) e expostas aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e 2 ng/mL de PDGF (controle positivo). **(B)** Imagem representativa ilustrando a ferida criada na monocamada de fibroblastos imediatamente após a lesão (zero Scratch 0 h) e após 16 h, conforme indicado em cada painel. As barras representam a média \pm SD de dois independentes experimentos (n=2). *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle basal por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABTS⁺ – 2,2-Azinobis (3- etilbenzotiazol-6-sulfonato)

ANOVA – Análise de Variância

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

BrdU – Ensaio de proliferação celular

CAT - Catalase

COX2 – Ciclooxygenase 2
CAT Catalase

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM – Dulbecco modified Eagle medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil,

EAC – Equivalente de ácido clorogênico

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FBS – Soro fetal bovino

FRAP – Poder antioxidante de redução férrica;

IC₅₀ – Concentração do extrato requerida para reduzir a quantidade de radicais livres por 50%

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

LPS – Lipopolissacarídeo

NBT – Cloreto de Nitroazul de Tetrazólio

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

MJ – Metil jasmonato

MS – Murashige e Skoog

MTT – (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

OPD – O-Phenilenediamina

PBS – Tampão fosfato-salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

Scratch assay – Ensaio de migração celular

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

CELESTINO, Mariana Magalhães Marchesi Ribeiro, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Outubro de 2023. **Efeito dos elicitores espermidina e metil jasmonato na cultura de calos de *Coffea canephora* sobre a produção de metabólitos bioativos com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante.** Orientador: Dr. Marcio Fronza. Coorientador: Dr. Victor Paulo Mesquita de Aragão.

A técnica de cultura de tecidos e células vegetais *in vitro* representa uma valiosa ferramenta no contexto da produção sustentável de metabólitos secundários. Esta abordagem permite a criação de condições controladas, e ao empregar elicitores, é possível estimular rotas biossintéticas visando a otimização da produção de metabólitos primários e secundários de interesse à saúde humana. Neste contexto, apesar do café destacar-se pela sua riqueza de compostos bioativos, até o momento, não foram conduzidos estudos que descrevam o uso dos elicitores Espermidina (Spd) e Metil jasmonato (MJ) para incrementar a síntese de metabólitos primários e secundários em culturas *in vitro* da espécie *C. canephora*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos elicitores Spd e MJ na produção de metabólitos bioativos com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante em cultura de calos derivados de folhas de *C. canephora*. Folhas do clone 501 foram submetidas a indução de calos e elicitados com Spd e MJ nas concentrações de 100 e 200 μM . Os extratos dos calos de *C. canephora* (ECCC) foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos, flavonoides e proteínas totais. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos ensaios químicos do ABTS, DPPH e FRAP. A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi investigada em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) pela inibição da produção de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Os efeitos sobre a proliferação e migração de fibroblastos foram avaliados pelos ensaios BrDU e *scratch assay*, respectivamente. Os resultados evidenciaram que os extratos elicitados tiveram um teor de proteínas superior ao não elicitado (controle), destacando os extratos elicitados com Spd e MJ 200 μM ($371,1 \pm 0,4$ e $384,1 \pm 1,4$ mg/100g de extrato, respectivamente). Os maiores teores de fenólicos ($532,44 \pm 1,94$ mg/100g) e flavonoides ($208,74 \pm 36,07$ mg/100g) foram obtidos após elicitação com MJ 200 μM , comparados ao grupo controle sem elicitor. A atividade antioxidante observada para o extrato elicitado com MJ 200 μM no ABTS, DPPH e FRAP apresentou valores de IC_{50} de 7x, 9x e 8x inferiores, respectivamente, comparados ao grupo controle sem elicitor. Todos os ECCC promoveram a proliferação e migração de fibroblastos e apresentaram a capacidade de suprimir os mediadores pró-inflamatórios NO, $\text{O}_2^{\bullet-}$, TNF- α , e IL-6 de forma dose-dependente, com destaque para o ECCC testado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e elicitado com MJ 200 μM . Portanto, os resultados deste estudo indicam, pela primeira vez, que a elicitação com Spd e MJ em culturas de calos de *C. canephora* revelou-se como uma estratégia promissora para a produção de metabólitos bioativos com potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante. Esses achados contribuem para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis na produção de metabólitos secundários com benefícios à saúde humana.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, células-tronco, café, calogênese, elicitores, bioativos

ABSTRACT

CELESTINO, Mariana Magalhães Marchesi Ribeiro, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, October 2023. **Effect of the elicitors spermidine and methyl jasmonate on the culture of *Coffea canephora* callus cells regarding the production of bioactive metabolites with potential antioxidant, anti-inflammatory, and wound healing activity.** Advisor: Dr. Marcio Fronza. Co-advisor: Dr. Victor Paulo Mesquita de Aragão.

The *in vitro* tissue and plant cell culture technique represents a valuable tool in the context of sustainable production of secondary metabolites. This approach allows the creation of controlled conditions, and by employing elicitors, it is possible to stimulate biosynthetic routes aiming to optimize the production of primary and secondary metabolites of interest to human health. In this context, although coffee stands out for its richness of bioactive compounds, to date, no studies have been conducted describing the use of the elicitors Spermidine (Spd) and Methyl jasmonate (MJ) to increase the synthesis of primary and secondary metabolites in *in vitro* cultures of the species *C. canephora*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of Spd and MJ elicitors on the production of bioactive metabolites with potential antioxidant, anti-inflammatory and healing activity in callus cultures derived from *C. canephora* leaves. Leaves of clone 501 were subjected to callus induction and elicited with Spd and MJ at concentrations of 100 and 200 μM . Extracts from *C. canephora* callus (ECCC) were analyzed for the content of phenolic compounds, flavonoids and total proteins. The antioxidant activity of the extracts was determined by chemical assays of ABTS, DPPH and FRAP. The *in vitro* anti-inflammatory activity was investigated in cultures of RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharides (LPS) by inhibiting the production of nitric oxide (NO), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). The effects on fibroblast proliferation and migration were evaluated by the BrDU and Scratch assay, respectively. The results showed that the elicited extracts had a higher protein content than the non-elicited (control), highlighting the extracts elicited with Spd and MJ 200 μM (371.1 ± 0.4 and 384.1 ± 1.4 mg/100g of extract, respectively). The highest levels of phenolics (532.44 ± 1.94 mg/100g) and flavonoids (208.74 ± 36.07 mg/100g) were obtained after elicitation with MJ 200 μM , compared to the control group without elicitor. The antioxidant activity observed for the extract elicited with 200 μM MJ in ABTS, DPPH and FRAP presented IC50 values of 7x, 9x and 8x lower, respectively, compared to the control group without elicitor. All ECCC promoted the proliferation and migration of fibroblasts and showed the ability to suppress the pro-inflammatory mediators NO, $\text{O}_2^{\bullet-}$, TNF- α , and IL-6 in a dose-dependent manner, with emphasis on the extract tested at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ and elicited with 200 μM MJ. Therefore, the results of this study indicate, for the first time, that elicitation with Spd and MJ in *C. canephora* callus cultures proved to be a promising strategy for the production of bioactive metabolites with antioxidant, anti-inflammatory and healing potential. These findings contribute to the development of sustainable strategies for the production of secondary metabolites with benefits for human health.

Keywords: *in vitro* culture, stem cells, coffee, callogenesis, elicitors, bioactives

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cultura de células-tronco vegetais: cultivo *in vitro* de calos

A cultura de células e tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas utilizadas para cultivar células e tecidos vegetais *in vitro*, para a multiplicação de plantas ou também para a produção de metabólitos primários e secundários de interesse à saúde (Ochoa-Villarreal et al., 2016). Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais, destacam-se a micropropagação, a embriogênese somática, a calogênese (cultura de calos), a cultura de embriões e a cultura em suspensão celular (Abdulhafiz et al., 2022). Especialmente, o cultivo de células-tronco vegetais, baseia-se na capacidade das células vegetais de se desdiferenciar e rediferenciar em qualquer tecido vegetal, sendo capaz de se multiplicar redefinindo uma nova via metabólica, tornando-se uma célula específica, com possibilidades de produzir novos tecidos e até mesmo uma nova planta (Ozyigit et al., 2023).

Esta técnica oferece múltiplas vantagens quando comparada ao cultivo de plantas no campo, tais como, cultivo em condições assépticas e condições ambientais controladas incluindo temperatura, luz e umidade (Akin-Idowu et al., 2009). No entanto, o sucesso da cultura é influenciada por diversos outros fatores, tais como: estado fisiológico da planta matriz, qualidade dos explantes, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento adequados (Ozyigit et al., 2023).

Em particular, na técnica de cultura de calos, estes podem desenvolver-se a partir de pequenos fragmentos de tecidos vegetais, chamados de explantes (fragmento de folha, raiz, caule ou qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura). Assim, logo após a desinfestação, os explantes são introduzidos *in vitro*, e cultivados em ambiente totalmente controlado para indução de calos (calogênese) (Buranasudja et al., 2021; Ozyigit et al., 2023). Ademais, o estabelecimento da cultura de calos é dividido em três etapas: (1) indução: organização do tecido isolado, metabolismo ativado para a desdiferenciação e também divisão celular; (2) divisão propriamente dita: ocorre divisão das células em tamanho menor, começando pelas periféricas e depois ocupando a região central do explante; e (3) desdiferenciação: o tecido deixa de ter sua identidade histológica, as células ficam maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão cai e há o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular (Umeda et al., 2021).

Uma vez estabelecidos, os calos são considerados agregados celulares com características amorfa, textura friável, coloração variável (incolor a tons de castanho-

claro) formando uma massa celular em proliferação (Fehér, 2019). A formação de um calo só é possível devido a uma propriedade intrínseca às células vegetais, que é a totipotência celular. A totipotência se refere a habilidade de uma célula vegetal viva, diferenciada e com suas estruturas íntegras de regredir ao estado meristemático (indiferenciado) e se regenerar em qualquer tecido vegetal, até mesmo em uma planta inteira, e produzir compostos que podem estar presentes desde as raízes até o fruto, visto que os calos contêm todas as informações genéticas de uma planta inteira, sendo considerados um agregado de células-tronco vegetal (Efferth, 2019; Fehér, 2019). Nesse contexto, a indução de calos em espécies de café arábica, em sua maioria está associada a embriogênese somática e melhoramento genético (Rezende et al., 2012). Santos et al. (2008) induziram calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner para estabelecer *in vitro* uma cultura de embriões somáticos, enquanto Santos et al. (2014) utilizaram calos embriogênicos para a micropropagação desta mesma espécie (Santos et al., 2008, 2014). Além disso, trabalhos relacionados a hibridização e produção de genótipos poliplóides de *C. canephora* e *Coffea arabica* L. também foram realizados utilizando as técnicas de indução de calos e embriogênese somática (Sanglard et al., 2017; Venial et al., 2020).

Diante do exposto, o cultivo de células-tronco vegetais é considerado uma fonte promissora para a produção sustentável e valiosa de metabólitos secundários à indústria (Manivannan et al., 2016). Nesse contexto, destaca-se o café, uma planta com vários compostos bioativos já descritos na literatura (Rodrigues et al., 2015), presentes desde as folhas até os grãos (Chen, 2019).

1.2 *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner

A existência de uma ampla variedade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos e alcaloides presentes no *C. arabica* e *C. canephora* estão relacionados à vários efeitos benéficos à saúde por possuírem diferentes atividades biológicas como antioxidante (Guidoni et al., 2023; Lemos et al., 2022; Pinheiro et al., 2021; Rodrigues et al., 2015), anti-inflamatória (Jung et al., 2017), antitumoral (Nigra et al., 2021), fotoprotetora (Kitagawa et al., 2011) e antimicrobiana (Almeida et al., 2006). Tais benefícios à saúde é devido à presença dos constituintes bioativos, como, por exemplo, a cafeína que tem cerca de 50% a mais em *C. canephora* do que os grãos de *C. arabica* (Depaula and Farah, 2019). Além da cafeína, os ácidos clorogênicos também estão presentes no café, sendo importantes e terapêuticos na saúde podendo desempenhar atividade biológica como, antioxidante, antibacteriana,

antiviral, ação hepatoprotetora, anti-inflamatória, antipirética, neuroprotetora, anti-hipertensivo, capacidade de eliminação de radicais livres e de estimulação do sistema nervoso central (Depaula and Farah, 2019).

Particularmente, com *C. canephora* foi desenvolvido um creme lipossomal obtido a partir de células-tronco, demonstrando que as feridas tratadas com esse creme tiveram uma reepitelização mais rápida, aumento do tecido granular nas feridas acelerando a cicatrização, regeneração do tecido e estimulação da produção de colágeno e neovascularização da pele. Além da modulação da resposta inflamatória com redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e um aumento de IL-10 e ainda aumento do fator de crescimento transformador beta e do fator de crescimento endotelial vascular, melhorando a qualidade do tecido cicatricial (Guidoni et al., 2022). Posteriormente, em outro estudo, com extratos de células-tronco de *C. canephora* foi observado alto conteúdo de compostos fenólicos com atividade antioxidante, proliferação e migração de fibroblastos e supressão dos mediadores pró-inflamatórios $O_2^{\bullet-}$, NO, TNF- α e IL-6 de forma dose dependente e ainda inibição do fator de transcrição NF-Kb, podendo o extrato ser utilizado como agente natural contra danos à pele (Guidoni et al., 2023).

Este potencial biotecnológico para a obtenção de compostos biologicamente ativos, é de interesse da indústria farmacêutica e/ou cosmética e a cultura de tecidos vegetais destaca-se como uma ferramenta biotecnológica para este fim. Assim, a investigação de princípios ativos oriundos da espécie *C. canephora* úteis aos diversos ramos da biotecnologia, e que possam ser empregados na indústria, tem despertado o interesse e a realização de pesquisas com a técnica de cultura de células/tecidos vegetais *in vitro* nesta espécie.

1.3 Elicitores no cultivo *in vitro*

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: primário e secundário. O metabolismo primário da planta está relacionado aos mecanismos vitais, como fotossíntese, respiração, absorção e assimilação de água e nutrientes, enquanto o metabolismo secundário, é gerado através do metabolismo primário na etapa de conversão de energia luminosa em energia química (Cardoso et al., 2019; Ozyigit et al., 2023). No metabolismo secundário, os compostos biodisponibilizados estão envolvidos no aumento da adaptabilidade das plantas a várias condições ambientes, principalmente moléculas para responder aos estresses bióticos e abióticos (Cardoso et al., 2019).

São denominados elicitores, compostos que possuem por função levar a ativação das vias de defesa vegetal, de modo a desencadear a produção de metabólitos secundários, que não são normalmente produzidos ou produzidos em baixa quantidade (Baenas et al., 2014). O efeito da estratégia de elicitação no metabolismo vegetal depende de vários fatores, como concentração, o tipo e o tempo de exposição do uso do estímulo na cultura (Giri and Zaheer, 2016). Ademais, por induzirem a produção dos metabólitos, a utilização de elicitores é uma técnica muito comum nas pesquisas científicas, devido à importância dos metabólitos secundários, seja na agricultura, farmacologia ou biotecnologia (Farag et al., 2016; Krishnan et al., 2015). A elicitação é então, um processo em que agentes estimuladores (elicitores) quando introduzidos no meio de cultivo *in vitro* promovem uma resposta dos mecanismos de defesa, se mostrando como uma técnica eficaz e relevante para aumentar a produção de fitoquímicos de interesse farmacológico e/ou cosmético (Baenas et al., 2014; Yue et al., 2016).

Os elicitores podem ser classificados de acordo com sua origem: biótica ou abiótica, e irão levar a reações diferentes dependendo do tipo. Elicitores bióticos são normalmente compostos oriundos dos patógenos ou predadores ou ainda compostos presentes nas vias de defesa vegetal, como é o caso do ácido salicílico (SA) e de compostos derivados do jasmonato, como o metil jasmonato (MJ) e ácido jasmônico (JA) (Baenas et al., 2014; Giri and Zaheer, 2016). Os elicitores abióticos são menos utilizados que os bióticos e podem ser químicos (íons metálicos, etanol e sais inorgânicos), agindo na integridade da membrana celular na planta, ou físicos (estresse osmótico, salino, nutricional, radiação UV), promovendo um estresse na planta, aumentando suas vias de defesa (Baenas et al., 2014; Giri and Zaheer, 2016; Sharma et al., 2020).

O elicitor MJ é um mensageiro de sinalização vegetal presente na resposta de defesa contra ferimentos, patógenos, temperatura e estresse, atuando como um componente de sinalização de estresse vital envolvido na resistência sistêmica adquirida (SAR) contra doenças e patógenos (Manivannan et al., 2016). O MJ tem sido amplamente utilizado para estudos de elicitação *in vitro* em cultura de calos (Yazdanian et al., 2022).

No estudo recente de Yazdanian et al. (2021), foram utilizados os elicitores químicos MJ e putrescina, na investigação de seus efeitos em diferentes características bioquímicas sob cultura de calos, nos quais os resultados mostraram maior eficiência do MJ comparativamente a putrescina no aumento dos metabólitos

secundários e atividade antioxidante em calos *Allium jesdianum*, além de maiores teores de fenólicos e flavonoides totais. Em adição, a atividade antioxidante pelo método DPPH também foi maior com a utilização de MJ (Yazdanian et al., 2022).

Poliaminas são compostos naturais formadas por aminas alifáticas semelhantes a fitohormônios, que exercem funções críticas no mecanismo de defesa das plantas diante de estresses ambientais. As poliaminas são benéficas para a homeostase de proteínas, desintoxicação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), ativação da maquinaria antioxidante e concedem tolerância de amplo espectro contra vários fatores de estresses ambientais, além do mais, estão envolvidas em vários processos celulares como viabilidade, divisão e proliferação celular, síntese de proteínas, replicação de DNA, regulação de variados processos fisiológicos, como embriogênese, desenvolvimento floral e amadurecimento e senescência de frutos (Yazdanian et al., 2022).

Interessantemente, Zhou et al. (2020) estudaram os efeitos da poliamina espermidina (Spd) e dicitohexilamina (DCHA, inibidor da síntese de espermidina) na atividade antioxidante e no estado energético do feijão-mungo em germinação. A Spd aumentou o conteúdo de fenólicos totais, de ácido ascórbico e a atividade antioxidante, porém reduziu as atividades e expressões gênicas de peroxidase (POD) e catalase (CAT). Tais alterações podem ser explicadas pelo aumento do conteúdo de H₂O₂ e das atividades da succínico desidrogenase (SDH), adenosina trifosfatases (ATPases) e citocromo c oxidase (CCO), resultando em maior adenosina trifosfato (ATP) e carga energética (EC). A Spd induziu o acúmulo de H₂O₂, melhorou o sistema antioxidante e o metabolismo energético para melhorar a qualidade nutricional dos brotos de feijão mungo (Zhou et al., 2020). No trabalho de Kim et al. (2015) foi demonstrado que a Spd funciona como um elicitador capaz de promover uma maior tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* contra os principais inibidores de fermentação (Kim et al., 2015).

No entanto, apesar das evidências e comprovações científicas descritas na literatura em *C. canephora*, ainda não há estudos descrevendo a utilização de MJ e da Spd como elicitores para o aumento da síntese de metabólitos secundários em culturas vegetais *in vitro* de calos de *C.canephora*.

1.4 Atividade antioxidante e anti-inflamatória

Antioxidantes são substâncias químicas ou produtos biológicos com capacidade de retardar o início do processo de oxidação de muitas moléculas,

especialmente ácidos graxos, nas quais reações acontecem na alimentação e no corpo humano, e podem provocar alterações fisiológicas levando a muitas doenças (Man et al., 2022). Os antioxidantes tem papel importante na prevenção de doenças crônicas, como o câncer, doenças cardíacas, derrame, doença de Alzheimer, artrite reumatoide e catarata, o que explica a realização de várias pesquisas na busca de compostos com propriedades antioxidantes (Man et al., 2022).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs, que incluem radicais livres e peróxidos, está além da capacidade protetora das defesas antioxidantes do nosso organismo. As EROs são produzidas naturalmente pelos organismos vivos como resultado do elevado consumo de oxigênio por componentes celulares, como mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático. No entanto, os radicais livres também podem ter origem exógena vindo da poluição do ar e da água, luz ultravioleta, álcool, tabaco etc (Man et al., 2022; Phaniendra et al., 2015).

As EROs quando induz a oxidação podem levar à desintegração da membrana celular, e mutações no DNA que exercem função essencial no envelhecimento (Kotha et al., 2022). O excesso de radicais livres pode desencadear ou intensificar ainda mais o desenvolvimento de várias doenças, como arteriosclerose, câncer, diabetes mellitus, lesão hepática, inflamação, danos na pele, doenças coronárias e artrite. Portanto, os antioxidantes ajudam a neutralizar os radicais livres antes que possam causar danos as células, sendo as defesas antioxidantes essenciais para a proteção dos componentes celulares e estabilização dos radicais livres (Bayr, 2005; Kotha et al., 2022).

Os antioxidantes podem ser endógenos, ou seja, são produzidos no metabolismo celular, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), CAT e glutathione peroxidase (GSH-Px). E ainda exógenos, não-enzimáticos, que dependem de uma alimentação regular de vitaminas como A, C e E, além de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante (Liguori et al., 2018).

Quando tratamos da ação antioxidante em *C. arabica* ou *C. canephora*, a literatura mostra a atividade dos extratos de café com atividade antioxidante significativa (Khochapong et al., 2021; Phan et al., 2021). Em *C. canephora*, extratos de grãos verdes de diferentes genótipos, bem como de flores apresentaram altas concentrações de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (Lemos et al., 2017; Pinheiro et al., 2021; Rodrigues et al., 2015).

Contudo, em outro estudo, quatro extratos de grão verde de diferentes genótipos de *C. canephora* apresentaram maiores atividades antioxidantes em

comparação aos extratos de *C. arabica* (Babova et al., 2016).

Em se tratando de estresse oxidativo e processo inflamatório, ambos estão relacionados, uma vez em que a produção de EROs pode modular muitos fatores de transcrição gerados por estresse, como AP-1, p53 e NF- κ B com função de regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, diferenciação celular e apoptose (Birben et al., 2012; Burton and Jauniaux, 2011). Ademais, no processo inflamatório as células inflamatórias são recrutadas para o local de dano e há produção de mais espécies reativas, podendo evoluir para um quadro crônico (Biswas, 2016; Reuter et al., 2010).

Durante o processo inflamatório, os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, interferindo na sinalização do estresse oxidativo e suprimindo as transduções de sinalização pró-inflamatória (Zhang and Tsao, 2016). A ação anti-inflamatória pode ser observada no estudo de Jung et al. (2017), onde extratos aquosos de grãos de café verde *C. arabica* reduziram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios (Jung et al., 2017). No estudo de Nigra et al. (2021), extratos aquosos de grãos de *C. canephora* obtiveram efeito antiproliferativo e citotóxico em células de câncer de mama em modelos de cultura celular 2D e 3D não prejudicando a viabilidade de células mamárias saudáveis (Nigra et al., 2021). Ademais, em um trabalho recente, foi avaliado os teores de ácido clorogênico, cafeína e as atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* de 9 genótipos de café conilon, uma cultivar de Arábica e uma de Robusta, com diferentes graus de maturação, e tanto o ácido clorogênico quanto a cafeína, tiveram teores mais elevados em todos os genótipos de conilon do que em arábica. O ácido clorogênico apresentou alta atividade antioxidante e anti-inflamatória e a cafeína elevada atividade anti-inflamatória (Lemos et al., 2022).

1.5 Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo biológico natural em que o corpo responde a uma lesão como forma de se proteger do ambiente externo enquanto o reparo da pele ocorre simultaneamente e esse processo pode ser dividido em três etapas que ocorrem de forma sobreposta: inflamação, reepitelização ou proliferação e remodelagem ou maturação do tecido (Napavichayanun and Aramwit, 2017).

A primeira fase da cicatrização é iniciada no momento em que ocorre a lesão, com ativação de plaquetas, adesão e agregação e liberação de grânulos plaquetários com fatores de crescimento. O coágulo é então formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório protéico para síntese de citocinas e fatores de

crescimento, aumentando seus efeitos. A resposta inflamatória se inicia com vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, produção de radicais livres pelos neutrófilos que auxiliam na destruição bacteriana, sendo substituídos por macrófagos que migram para a ferida após 48 - 96 horas da lesão e têm papel no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, importantes na transição para a fase proliferativa (Nazir et al., 2022).

A fase proliferativa ou de formação do tecido é responsável pelo fechamento da ferida propriamente dita. A reepitelização se inicia horas após a lesão com migração de queratinócito não-danificados na ferida. Posteriormente ocorre a fibroplasia e formação da matriz, para formação do tecido de granulação. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares. As células endoteliais e os fibroblastos migram para ferida, e estes últimos possui o fator de crescimento que é o PDGF. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzir colágeno tipo I, levando a contração da ferida (Lindley et al., 2016; Nazir et al., 2022).

A fase de maturação ou remodelamento constitui-se pela deposição de colágeno de maneira organizada, sendo no início mais fino do que o colágeno da pele normal. O colágeno inicial, tipo III é reabsorvido e um mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga e mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará em torno de 80% após três meses (Lindley et al., 2016; Nazir et al., 2022).

Extratos de plantas têm sido usados no reparo de tecidos como em emulsões contendo óleo de *Calendula officinalis* que apresentaram maior recrutamento de células inflamatórias para o local da ferida, sendo eficaz no processo de cicatrização (Okuma et al., 2015). Em um estudo de Dos Santos Gramma et al. (2016), uma preparação farmacêutica de 5% do extrato etanólico de *Struthanthus vulgaris* aumentou o tecido de granulação, modulou a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, e levou à deposição e organização das fibras colágenas nas feridas. Além disso, o extrato metanólico das folhas de *Hibiscus micranthus* exibiu potencial atividade antibacteriana contra os microrganismos testados e atividade cicatrizante pela presença de alcalóides, flavonóides, entre outros, modulando as fases do

processo de cicatrização, sendo anti-inflamatórios, antioxidantes (Begashaw et al., 2017). Não obstante, no estudo Guidoni et al. (2022), a aplicação tópica de uma mistura lipossomal com extratos de células-tronco de *C. canephora* em ratos com feridas proporcionou uma melhor cicatrização de ferida, redução da inflamação quando comparado ao grupo controle, além do aumento de colágeno no local da ferida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos elicitores Espermidina (Spd) e Metil jasmonato (MJ) na produção de metabólitos bioativos com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante em cultura de calos derivados de folhas de *C. canephora*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia dos elicitores Spd e MJ na produção de metabólitos secundários em cultura de calos de *C. canephora*;
- Avaliar os efeitos dos elicitores sobre o teor de proteínas totais nos extratos;
- Determinar os efeitos dos elicitores sobre o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de calos obtidos a partir de diferentes elicitores;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos diferentes extratos; e
- Avaliar os efeitos na proliferação e migração de fibroblastos *in vitro* dos diferentes extratos elicitados.

3. METODOLOGIA

3.1 Material vegetal

Folhas de *C. canephora* (clone 501) foram coletadas na zona rural do município de Muqui no estado do Espírito Santo na Fazenda São Luiz, no Sítio Esperança (20°52'58.2"S 41°19'27.7"W) a 450 metros de altitude.

3.2 Desinfestação do material vegetal

Após a coleta e transferência para o laboratório, foram selecionadas folhas

bem expandidas, de cor verde-intensa e isentas de sinais de lesões, doenças ou ataque de insetos. Estas folhas foram lavadas em água corrente por 3 vezes durante 5 minutos. Posteriormente, imersas em etanol a 70% (v/v) por 2 minutos e logo em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2,5% de cloro ativo por 20 minutos. Após isso, as folhas foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar e em seguidas introduzidas *in vitro* (Guidoni et al., 2023).

3.3 Indução de calos

A indução de calos foi realizada em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) meia força (Metade da concentração de nutrientes totais recomendada) (Murashige and Skoog, 1962) contendo sacarose (20 g/L), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a 10 μ M e Phytigel[®] (2,0 g/L) com adaptações (Guidoni et al., 2023). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121°C, por 20 minutos à 1,5 atm. Explantes (\pm 2 cm) foram obtidos das folhas desinfestadas e inoculados no meio de cultura. Em seguida, incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) no escuro na temperatura de 25 \pm 2°C. Foram inoculados 150 explantes, individualizados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura. Após 45 dias, os calos induzidos foram repicados para multiplicação da massa celular e usados em todos os experimentos.

3.4 Elicitação dos calos com Metil jasmonato e Espermidina

A elicitação dos calos foram feitas utilizando Spd ou MJ (Baenas et al., 2014; Yazdanian et al., 2022). Para tanto, foram usadas as concentrações de 0, 100 e 200 μ M de Spd ou MJ. As soluções padrões dos elicitores foram filtradas por membranas 0,22 μ m e posteriormente adicionadas ao meio de cultura nas concentrações supracitadas acima. O subcultivo foi realizado em meio de cultura MS meia força suplementado com sacarose (20 g/L), 2,4-D (10 μ M) e Phytigel[®] (2,0 g/L) (Guidoni et al., 2023; Murashige and Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos à 1,5 atm. As soluções dos elicitores foram preparadas e tiveram seu pH ajustado para 5,7. Após o resfriamento do meio de cultura, as soluções contendo os elicitores foram incorporadas a eles, utilizando seringas descartáveis acopladas a filtros contendo poros de 0,22 μ m, sendo esse procedimento realizado em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, foram preparadas 10 placas de petri estéreis por tratamento contendo 3 calos em cada placa.

As culturas de calos permaneceram em contato com Spd e MJ por 15 dias, no qual foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D no escuro com temperatura de 25 ± 2 °C.

3.5 Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos foram preparados conforme a metodologia descrita na literatura com modificações (Guidoni et al., 2023; Nigra et al., 2021). Os calos sem elicitores ou na presença dos elicitores, Spd ou MJ, foram coletados, pesados e triturados por 5 minutos em liquidificador, utilizando etanol 70%, na proporção de 10% (m/v). Posteriormente, o material foi submetido ao ultrassom por 16 minutos e em seguida centrifugado a 6000 g por 15 minutos à 20°C. O sobrenadante foi coletado, rotaevaporado e liofilizado. Após a liofilização, os extratos dos calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com Spd 100 µM, Spd 200 µM, MJ 100 µM e MJ 200 µM foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados a -20 °C para a realização dos experimentos.

3.6 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford com modificações (Lorençoni et al., 2021). Para o ensaio foram utilizados 5 µL de solução amostra e 200 µL do reagente Bradford. Para a curva padrão foi utilizada a albumina e as leituras foram realizadas a 595 nm, e os resultados foram expressos em mg/100g do extrato.

3.7 Quantificação de polifenóis totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Esquivel-Alvarado et al., 2020). No ensaio, foram utilizados 200 µL de água ultrapura, 15 µL de reagente Folin-Ciocalteu, 30 µL de amostra e 50 µL de carboato de sódio (20%, p/v) em microplaca. A absorbância foi medida imediatamente a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido clorogênico por 100 gramas de extrato (mg de EAC/100 g de extrato). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

3.8 Quantificação de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi realizado por método espectrofotométrico empregando cloreto de alumínio conforme descrito na literatura com modificações (Xu

and Chang, 2007). No ensaio, em microplaca foram adicionados 180 μL de amostra e 15 μL de NaNO_2 2,5 %. Após seis minutos foram adicionados 15 μL de AlCl_3 10% e, após cinco minutos, foram adicionados 50 μL de NaOH 1M. Permaneceu por 10 minutos à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina. As leituras foram realizadas a 415 nm e os resultados expressos em miligramas equivalentes de quercetina por 100 gramas de extrato (mg eq quercetina/100 g de extrato). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

3.9 Ensaios químicos de atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada pelos métodos colorimétricos do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) a 734nm (Re et al., 1999), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) a 517 nm (Blois, 1958), a capacidade redutora do íon Fe^{3+} para o íon Fe^{2+} pelo método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) a 595 nm (Benzie and Strain, 1996). Os resultados foram expressos como um valor de IC_{50} (mg/mL) de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

3.10 Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

Para investigar a atividade citotóxica foi realizado o método colorimétrico do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983). Foram utilizadas culturas de células fibroblastos (L929) e macrófagos RAW 264.7. As células foram incubadas com diferentes concentrações (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos por 24h a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após, a cultura foi incubada com o MTT por 2h e posteriormente adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos com agitação para dissolução dos cristais de formazana. A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA (Elisa Spectracount Packad – EUA), utilizando-se filtros de 595 nm.

3.11 Determinação de óxido nítrico *in vitro*

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi determinada pela influência do estresse oxidativo sobre a produção de NO em cultura de macrófagos (Guidoni et al., 2023; Soares et al., 2021). Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir a 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos por 60 minutos antes ou depois da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após as 24h, o sobrenadante celular foi

utilizado para a quantificação de nitrito onde a amostra foi misturada ao mesmo volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletlenodiamina em água; 1:1) e a concentração de nitrito calculada por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio. A leitura da absorbância das placas para a quantificação de nitrito foi feita em leitor de ELISA, utilizando-se filtros de 540 nm.

3.12 Redução da produção do ânion superóxido

O potencial efeito inibitório dos extratos utilizados sobre a produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS foi avaliado pelo ensaio do superóxido (Guidoni et al., 2023; Soares et al., 2021). Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 96 poços e pré-tratadas com concentrações crescentes (0, 1, 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos e estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Após incubação por 20h (5% de CO_2 a 37°C) o sobrenadante foi desprezado e adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) e incubadas por 2h. Após isso, as células passaram pela lavagem com metanol e secas e então os cristais de formazana formados serão 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.

3.13 Determinação de citocinas *in vitro*

O 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 (0,1, 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos por 60 minutos antes da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$). Após 24h, o sobrenadante celular foi usado para quantificar as citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). As citocinas foram detectadas por meio de anticorpos de captura, e anticorpos biotinizados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific®). Foi utilizado o substrato o-Phenylenediamine (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada com o ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com filtro de 420 nm. A concentração de cada citocina foi determinada pela equação da reta comparando-se

as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para cada citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras.

3.14 Estudo do efeito dos extratos sobre a proliferação celular - BrdU

O efeito sobre a proliferação de fibroblastos foi determinado utilizando Kit de quantificação da proliferação celular-BrdU. As células de fibroblastos foram mantidas em cultura com meio Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, 5% de CO₂. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3000 células/poço, com 90 µL de meio sem SFB. Após 24 horas, os efeitos do extrato de calos de café nas concentrações de 1, 10 e 100 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 com um anticorpo anti-BrdU de acordo com as instruções e especificações do fabricante (Roche® Mannheim, Alemanha).

3.15 Efeito dos extratos na migração de fibroblastos - *Scratch assay*

A análise da proliferação e migração de fibroblastos foi realizada utilizando o *Scratch assay* como modelo experimental (de Christo Scherer et al., 2019; Fronza et al., 2009). As células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem uma monocamada confluenta. Uma ferida linear artificial (*scratch*) foi induzida na monocamada. As placas foram lavadas com solução salina estéril (PBS) para remoção das células durante a realização da ferida. Posteriormente, as monocamadas foram tratadas por 16 horas com 10 e 100 µg/mL dos extratos. Foi utilizado como controle positivo o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na concentração de 2 ng/mL. Após o tratamento, as células foram fixadas e coradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Imagens das áreas raspadas foram feitas com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio. A migração das células para o interior da região raspada (do *scratch*) foi quantificada usando CellC software®. Os resultados foram relatados como porcentagem de células que migraram e/ou proliferaram na área lesionada em comparação ao grupo de controle não tratado.

3.16 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 (EUA). Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão (SD). As comparações estatísticas foram feitas por meio de análise de variância univariada

(ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados e em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos extratos de calos de *C. canephora*

Calos de *C. canephora* foram cultivados em meio simples e após 4 repiques foram elicitados com 0, 100 e 200 μM de Spd ou MJ. Após cultivo, os calos foram submetidos ao processo de extração e liofilizados, resultando em cinco extratos secos, denominados de extrato controle (sem elicitor), Spd 100 (elicitado com 100 μM de espermidina), Spd 200 (elicitado com 200 μM de espermidina), MJ 100 (elicitado com 100 μM de metil jasmonato) e MJ 200 (elicitado com 100 μM de metil jasmonato).

Sendo assim, a cultura de calos proporcionou rendimentos de 1,94% para o extrato de controle, 1,71% e 2,11% para os calos elicitados com Spd nas concentrações de 100 e 200 μM , respectivamente, e 1,60% e 1,72% para os calos elicitados com de MJ nas concentrações de 100 e 200 μM , respectivamente.

4.2. Teor de proteínas nos extratos de calos de *C. canephora*

A concentração de proteínas totais nos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) estão representadas na Tabela 1. Os extratos elicitados com Spd 200 e MJ 200 μM apresentaram os maiores teores de proteínas ($371,3 \pm 0,4$ e $384,1 \pm 1,4$ mg/100g de extrato, respectivamente) com diferença significativa em relação aos demais extratos (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de proteínas totais nos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ.

ECCC	Concentração de proteínas (mg/100g de extrato)
Controle	$308,0 \pm 0,8^a$
Spd 100 μM	$321,2 \pm 0,4^a$
Spd 200 μM	$371,3 \pm 0,4^b$
MJ 100 μM	$324,5 \pm 1,5^a$
MJ 200 μM	$384,1 \pm 1,4^b$

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm DP ($n = 3$). Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.3. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides

O conteúdo de fenólicos totais e flavonoides nos ECCC estão representados na tabela 2. O maior teor de fenólicos e flavonoides foi encontrado no extrato elicitado com MJ 200 μM (532,44 \pm 1,94 mg de EAC/100 g de extrato) e (208,74 \pm 36,07 mg de quercetina/100g de extrato), respectivamente.

Tabela 2. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides nos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ.

ECCC	Fenólicos*	Flavonoides **
	(mg equivalentes de Ácido clorogênico/100g)	(mg equivalentes de quercetina/100g)
Controle	40,77 \pm 3,33 ^a	13,69 \pm 0,48 ^a
Spd 100 μM	48,00 \pm 0,83 ^b	14,89 \pm 0,19 ^a
Spd 200 μM	51,88 \pm 0,55 ^b	12,42 \pm 0,01 ^a
MJ 100 μM	45,91 \pm 1,25 ^b	14,63 \pm 1,14 ^a
MJ 200 μM	532,44 \pm 1,94 ^c	208,74 \pm 36,07 ^b

*Resultados expressos em mg de equivalentes de ácido clorogênico por 100 gramas de extrato de *C.canephora*; **resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina por 100 gramas de extrato de *C.canephora*. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$). Os testes foram realizados em duplicata e os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

4.4. Atividade antioxidante dos extratos de calos de *C. canephora*

Os ECCC demonstraram atividade antioxidante nos três métodos químicos investigados: ABTS, DPPH e FRAP (Tabela 3). A atividade de captura de radicais livres foi expressa pelo valor do IC₅₀ em mg/mL.

As maiores atividades antioxidantes foram encontradas no extrato elicitado com MJ 200 μM no ensaio do ABTS, DPPH e FRAP com valores de IC₅₀ de 0,47 \pm 0,01, 0,89 \pm 0,11 e 0,06 \pm 0,01 mg/mL, respectivamente. Também foi observado que o ECCC MJ 200 μM exibiu diferença significativa em comparação a todos os outros extratos, destacando-se assim por sua notável atividade antioxidante (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade antioxidante dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sem elicitor (controle) e, elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ determinada pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP.

ECCC	IC ₅₀ [mg/mL]		
	ABTS	DPPH	FRAP
Controle	3,15 \pm 0,015 ^b	7,90 \pm 0,07 ^{ab}	0,50 \pm 0,09 ^c
Spd 100 μM	3,40 \pm 0,39 ^b	8,57 \pm 0,38 ^a	0,46 \pm 0,01 ^c
Spd 200 μM	2,96 \pm 0,18 ^b	7,08 \pm 0,30 ^c	0,47 \pm 0,04 ^c
MJ 100 μM	4,78 \pm 0,10 ^a	5,22 \pm 0,16 ^d	0,79 \pm 0,02 ^b
MJ 200 μM	0,47 \pm 0,01 ^c	0,89 \pm 0,11 ^e	0,06 \pm 0,01 ^d

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) calculadas por ANOVA. Os testes foram realizados em duplicata ($n=2$), e os resultados como média \pm desvio padrão.

4.5. Efeitos dos extratos de calos de *C. canephora* sobre a viabilidade de fibroblastos e macrófagos

Inicialmente, foram realizadas análises para avaliar os efeitos dos ECCC sobre a viabilidade celular *in vitro* utilizando as linhagens celulares de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7. Os resultados obtidos revelaram de maneira conclusiva que todos os extratos analisados, nas diversas concentrações testadas, variando de 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram efeitos citotóxicos em ambas linhagens celulares testadas (Figura 1A e B).

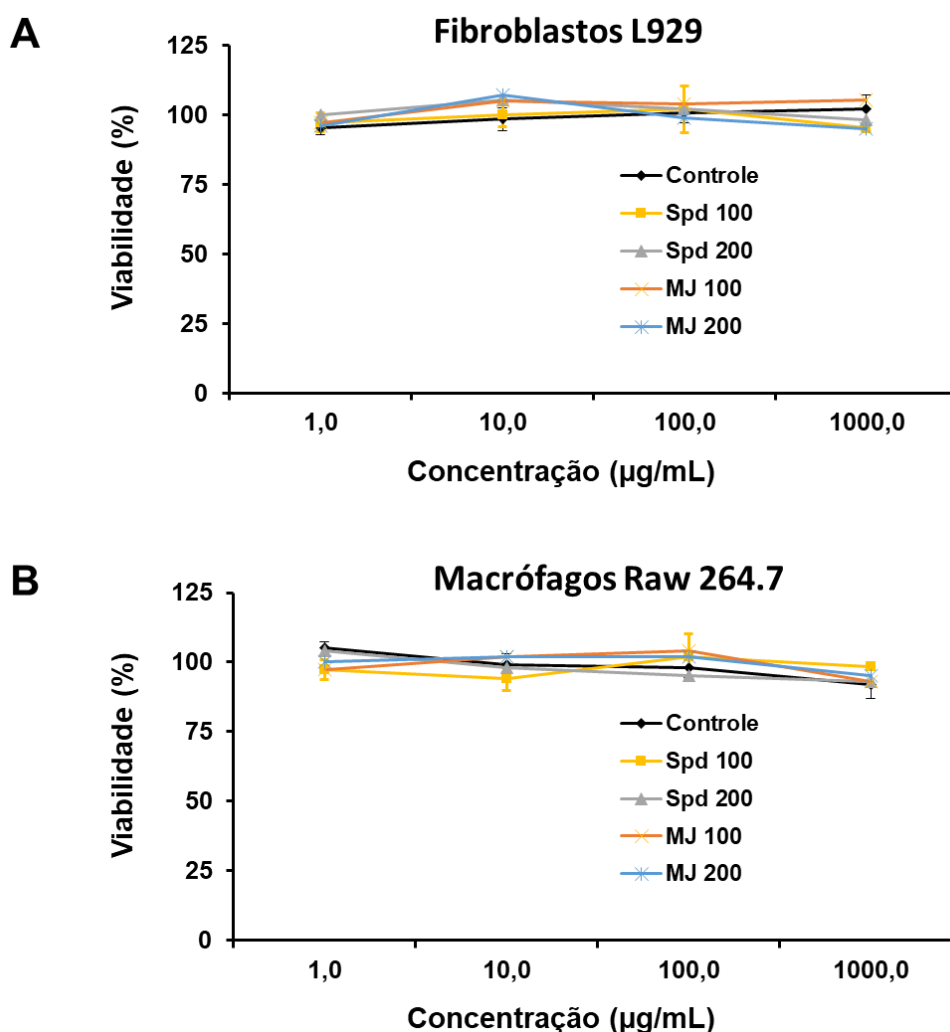


Figura 1. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a viabilidade de fibroblastos L929 (A) e macrófagos RAW 264.7 (B). As células foram expostas por 24h aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 µM de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm DP de células viáveis, comparada ao grupo controle, de três experimentos independentes (n=3).

4.6. Redução da produção de óxido nítrico *in vitro*

Todos os ECCC, na maior concentração testada (100 µg/mL), foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO quando comparado ao grupo estimulado por LPS (Figura 2). Destacaram-se os extratos elicitados com 200 µM de Spd ou/e MJ, os quais reduziram de forma significativa a produção de NO nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, alcançando reduções de 32,05 e 40,86% para a Spd, e de 37,47 e 44,70% para o MJ, respectivamente (Figura 2).

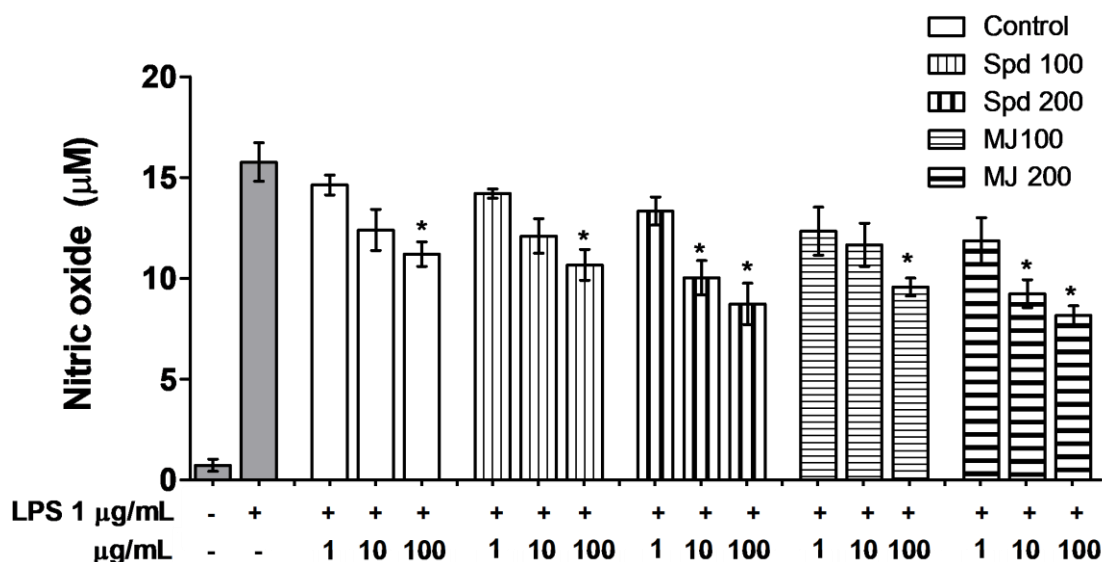


Figura 2. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS 1 µg/mL. As células foram expostas por 24h aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 µM de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Os resultados foram expressos como média ± DP de dois experimentos independentes (n=2). Significância estatística ($p < 0,05$). * grupo tratado comparado ao controle LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

4.7. Redução da produção do ânion superóxido *in vitro*

Os ECCC também apresentaram efeito inibitório na produção do radical superóxido de forma dose dependente em cultura de macrófagos estimulados com LPS (figura 3). Os extratos elicitados com Spd 200 µM e MJ 100 µM, reduziram significativamente a produção de $O_2^{\bullet-}$, em 40,5% e 38,1%, respectivamente, apenas na máxima concentração testada (100 µg/mL), quando comparada ao grupo estimulado por LPS. Destaque para os calos elicitados com MJ 200 µM que apresentaram as melhores atividades com redução significativa da produção de $O_2^{\bullet-}$ alcançando inibições de 50,8 e 53,8% após exposição as concentrações de 10 e 100 µg/mL, respectivamente, quando comparado ao grupo controle LPS. O ECCC do grupo controle e o extrato elicitado com Spd 100 µM em todas as concentrações testadas não apresentaram efeitos significativos (Figura 3).

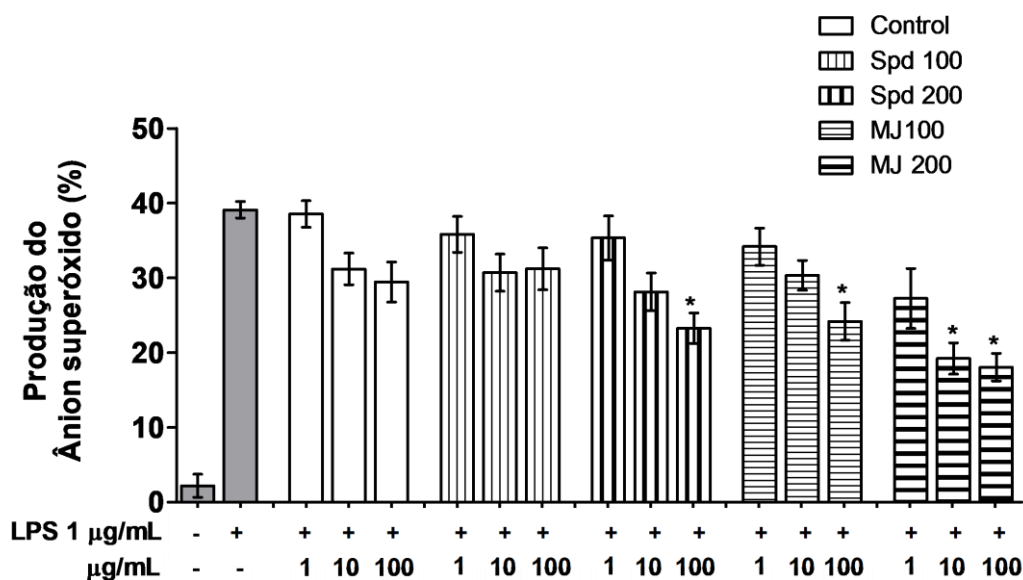


Figura 3. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) sobre a concentração do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) após 24 h de tratamento. As células foram expostas aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes ($n=2$). Significância estatística ($p < 0,05$). *grupo tratado comparado ao controle LPS por via unidirecional ANOVA seguida de teste post hoc de Tukey.

4.8. Redução da produção de citocinas *in vitro*

Com relação à produção de citocinas, os efeitos dos ECCC elicitados com Spd e MJ na produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram determinadas em cultura de macrófagos estimulados com LPS. Os resultados estão apresentados na Figura 4. Todos os extratos, incluindo o grupo controle sem o emprego de elicitores, apresentaram efeito dose dependente na redução da concentração das citocinas TNF- α e IL-6 quando testados na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Destaque para o elicitor MJ que apresentou os melhores resultados na inibição das citocinas estudadas. Tanto para os calos elicitados com 100 μM quanto para os calos elicitados com 200 μM e posteriormente testados nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observou-se efeitos inibitórios significativos (Figura 4).

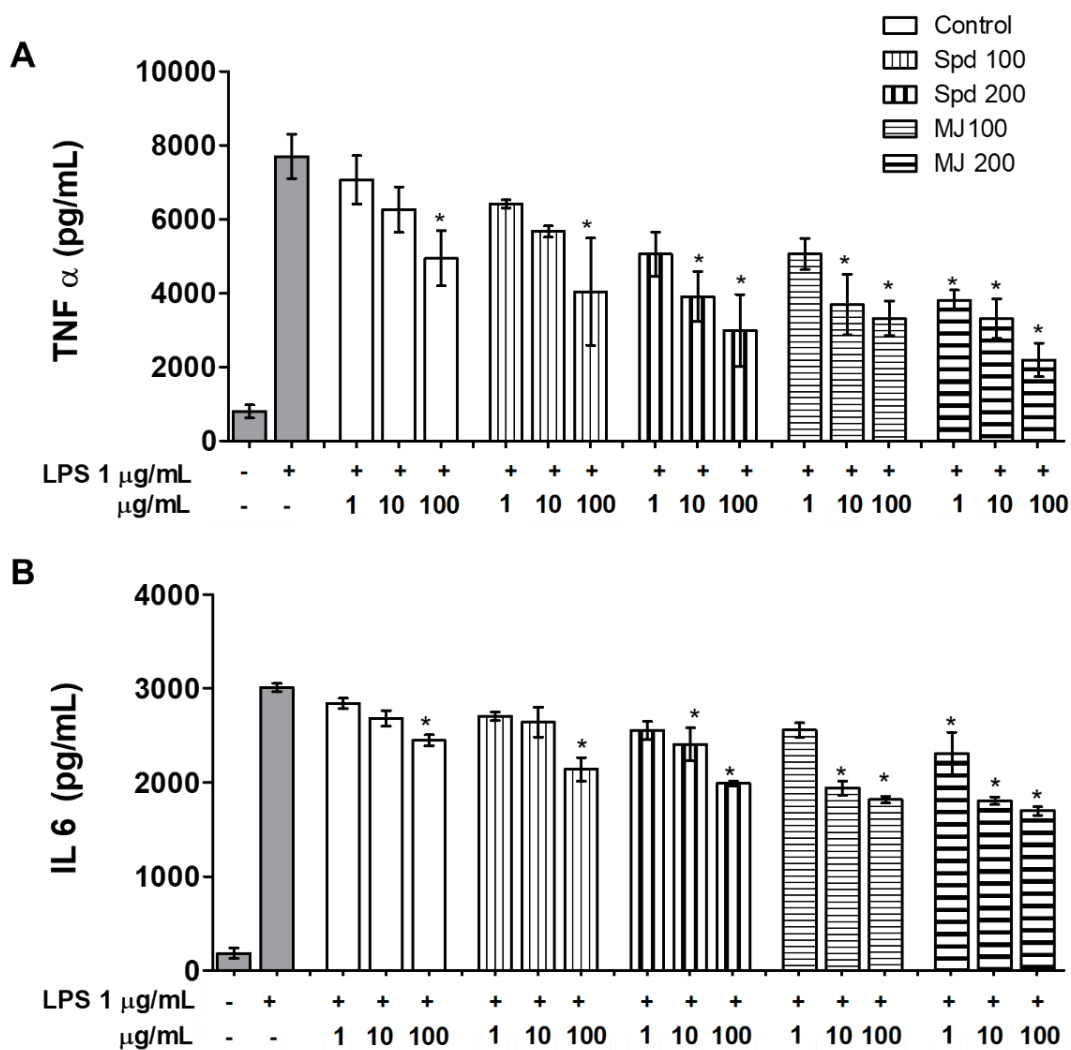


Figura 4. Efeito dos extratos de calos de *C. canephora* (ECCC) na inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF α (A) e IL-6 (B). Os extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μ M de Spd e MJ foram testados nas concentrações de 1, 10 e 100 μ g/mL em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL). Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes (n=2). *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com células induzidas por LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

4.9. Proliferação de fibroblastos *in vitro* – BrDU

As células tratadas com ECCC também demonstraram um aumento significativo na incorporação de BrDU no DNA, indicando efeito estimulador na proliferação de fibroblastos que foi medido pela densidade óptica da cultura em todas as concentrações testadas (Figura 5). Com exceção do grupo controle, sem elicitor, nas concentrações de 1 e 10 μ g/mL e o extrato elicitado com Spd 100 μ M na concentração de 1 μ g/mL, todos os demais extratos apresentaram um efeito estimulatório sobre a proliferação comparado com o controle basal. Destaque mais uma vez para o extrato elicitado com MJ 200 μ M que, nas concentrações de 1, 10 e

100 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um efeito estimulatório significativo e expressivo alcançando aumentos de 42,5%, 96,7% e até 101,9 %, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 5).

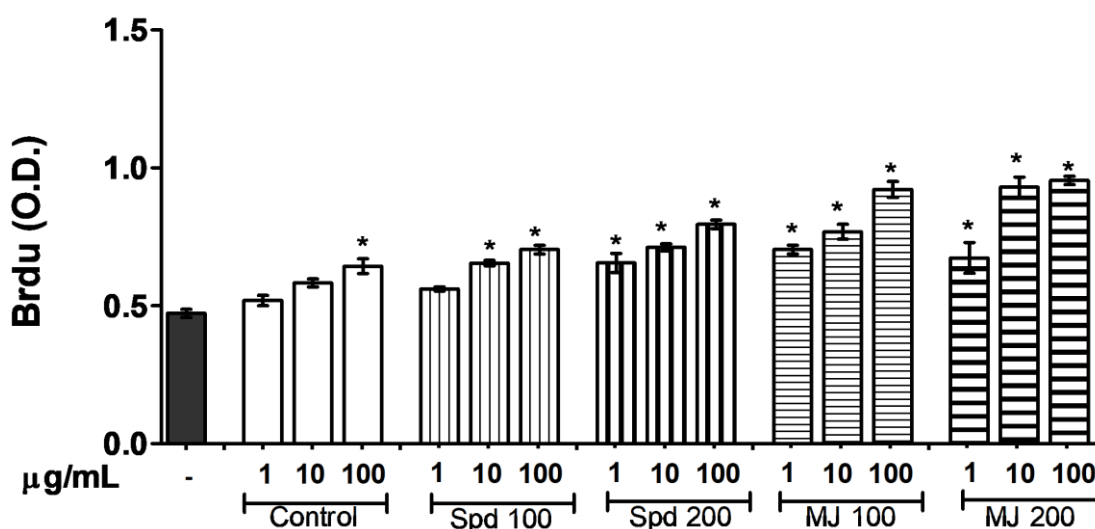


Figura 5. Efeito dos ECCC na proliferação de fibroblastos. As células foram expostas aos extratos sem elicitor (controle) e elicitados com 100 e 200 μM de Spd e MJ foram testados nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes ($n=2$). *Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle basal por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.10. Efeitos dos extratos na migração celular *in vitro*

Para avaliar os efeitos dos ECCC sobre a migração celular *in vitro*, foi realizado o ensaio de “scratch assay” utilizando fibroblastos. Os resultados demonstraram que todos os ECCC promoveram um efeito estimulatório sobre a migração de fibroblastos na ferida artificial de forma dose dependente (Figura 6). Uma estimulação de 32,30% e 45,50% foi observada após exposição com os ECCC MJ 100 μM e testados nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Para os ECCC MJ 200 μM e testados nas mesmas concentrações o efeito estimulatório foi ainda superior, alcançando valores de 49,37% e 61,07%, respectivamente. Esses valores demonstraram ser inclusive superiores ao efeito estimulatório observado no controle positivo de PDGF, o qual atingiu a marca de 45,25% (Figura 6).

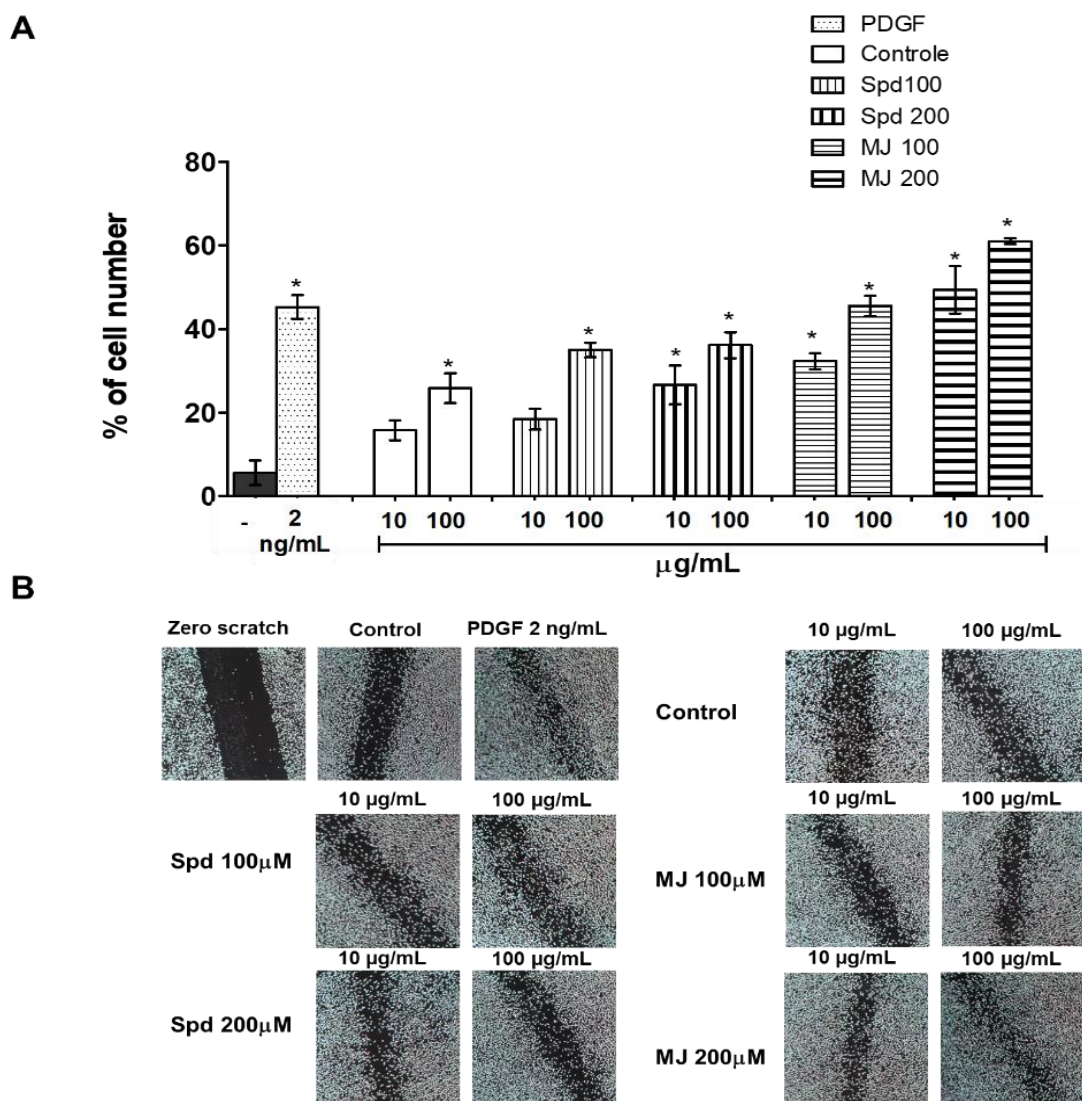


Figura 6. Efeito dos ECCC na migração de fibroblastos no *scratch* assay. **A)** Porcentagem do número total de células presentes na ferida artificial após 16 h de incubação (37 °C a 5% CO₂) e expostas aos extratos sem elicitador (controle) e elicitados com 100 e 200 µM de Spd e MJ nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, e 2 ng/mL de PDGF (controle positivo). **(B)** Imagem representativa ilustrando a ferida criada na monocamada de fibroblastos imediatamente após a lesão (zero Scratch 0 h) e após 16 h, conforme indicado em cada painel. As barras representam a média ± SD de dois independentes experimentos (n=2). *Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle basal por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

5. DISCUSSÃO

A utilização das técnicas de cultura de tecidos vegetais emerge como uma ferramenta valiosa na busca sustentável por compostos biologicamente ativos destinados à produção de medicamentos e produtos cosméticos, com inúmeros benefícios para a saúde humana. Pela primeira vez, neste estudo investigaram-se os efeitos dos elicitores Espermidina e Metil jasmonato na cultura de calos de *Coffea canephora*. Os extratos obtidos, especialmente após a elicitação com MJ, demonstraram propriedades farmacoterapêuticas *in vitro* capazes de melhorar a saúde da pele de forma abrangente, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além da capacidade de estimular a proliferação e migração de fibroblastos.

A cultura de tecidos vegetais também tem sido indicada como instrumento para aumentar a concentração dos metabólitos primários e secundários em diferentes plantas, constituindo um sistema apropriado para a produção de desses importantes compostos com propriedades farmacológicas. Pesquisas bem-sucedidas têm demonstrado a eficiência desta tecnologia na produção de metabólitos primários e secundários tanto em calos como em suspensão de células (Abdulhafiz et al., 2022; Guidoni et al., 2023; Wang et al., 2017).

Em nosso estudo, o teor de proteínas totais presente nos extratos foi avaliado como um indicador do efeito dos elicitores sobre o metabolismo primário de *C. canephora*. Proteínas e aminoácidos desempenham um papel fundamental na saúde e na função da pele, atuando na sua recuperação e regeneração, na proteção contra radiação solar, no combate a radicais livres e melhorias da aparência da pele (Solano, 2020). Dessa forma, são considerados componentes essenciais em formulações tópicas com propriedades terapêuticas (Miastkowska and Sikora, 2018). Portanto, os resultados do presente estudo demonstraram que tanto a Spd quanto o MJ podem estimular e aumentar a produção de proteínas totais nos extratos. Essa descoberta ressalta o potencial desses elicitores na promoção de respostas metabólicas benéficas nas plantas, com implicações importantes para as aplicações terapêuticas benéficas dos extratos de *C. canephora* principalmente a saúde e integridade da pele (Abdulhafiz et al., 2022; Solano, 2020).

Em relação ao conteúdo de metabólitos secundários, os resultados obtidos neste estudo também destacam e enaltecem a eficácia desta ferramenta biotecnológica quando associada ao uso de elicitores para aumentar os teores de

fenólicos totais e flavonoides. Para exemplificar, o ECCC elicidado com 200 μM de MJ demonstrou um aumento expressivo de 13 vezes e 15 vezes nos teores de fenólicos e flavonoides, respectivamente, em comparação com o grupo que não foi empregado elicidores. Diversas pesquisas já demonstraram que o emprego de elicidores bióticos e abióticos podem estimular significativamente o teor total de fenólicos, flavonoides e outros metabólitos secundários em diversas espécies de plantas (Abdulhafiz et al., 2022; Espinosa-Leal et al., 2018; Ozyigit et al., 2023). Ho e colaboradores (2018) relataram que os teores de fenólicos aumentaram aproximadamente 2 vezes em amostras de raízes de *Polygonum multiflorum* elicidadas com 50 μM de MJ. Lucho et al. (2019) demonstraram que o uso de 100 μM de MJ resultou em um aumento de 29% no conteúdo de fenólicos totais na *Stevia rebaudiana* Bertoni. Os teores de ginsenosídeo, xantotoxina e bergapten aumentaram 1,1 vezes, 6 vezes e 7 vezes, respectivamente, pela elicitação de 100 μM de MJ em cultura de *Changium myrnioides* (Cai et al., 2017). A otimização da concentração de MJ e o tempo de exposição são fatores críticos de importância fundamental para aprimorar a síntese de metabólitos secundários (Ho et al., 2020).

É de notório saber, e diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos dos compostos fenólicos e flavonoides obtidos de diversas fontes, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, apresentando efeitos positivos em uma ampla variedade de patologias, incluindo inflamação, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e o envelhecimento precoce (de Lima Cherubim et al., 2020; Lutz et al., 2019; Rahman et al., 2021). Neste contexto, é importante destacar e enaltecer a importância desta valiosa ferramenta sustentável para a obtenção de altos teores desses bioativos, em comparação aos métodos extrativos tradicionais.

Em nosso estudo, observou-se uma relação positiva entre o teor de fenólicos e flavonoides com a atividade antioxidante dos extratos. De forma similar, o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides observados em extratos de calos de *Gynura procumbens* (Krishnan et al., 2015), de *Rhodiola imbricata* (Kapoor et al., 2018), e de *Polyalthia bullata* (Kamarul Zaman et al., 2020) também apresentaram correlações com a atividade antioxidante determinada pelo ensaio do sequestro do radical livre DPPH. No estudo de Lucho et al. (2019) extratos etanólicos de folhas de *S. rebaudiana* elicidadas com MJ observou-se aumento do conteúdo de fenólicos totais e da atividade antioxidante em comparação aos extratos elicidados com Spd e ácido salicílico (Lucho et al., 2019). Estudo recente de Guidoni et al. (2023) avaliando extratos aquosos de

suspensões de células-tronco de *C. canephora* sem a presença de elicitores, também descreveu a atividade antioxidante pelos ensaios do ABTS e do FRAP e sua correlação com o teor de fenólicos. Neste contexto, pela primeira vez na literatura, nossos resultados evidenciaram o aumento significativo da atividade antioxidante nos ECCC após emprego de elicitores, especialmente do MJ na concentração de 200 μM , e este resultado pode ser diretamente correlacionado com o aumento significativo de fenólicos totais presentes neste extrato.

A elicitação de MJ exógeno em culturas *in vitro* é responsável pela indução de EROs, regulação da resposta de defesa por acúmulo de atividade de enzimas antioxidantes, estimulação da transdução de sinal molecular, regulação da expressão genética que leva ao acúmulo de metabólitos secundários (Ho et al., 2020). Quando os teores de EROs excedem os mecanismos de defesa, as células entram em um estado de estresse oxidativo. Embora as EROs desempenhem o papel de segundos mensageiros em processos celulares, como a tolerância a estresses ambientais em baixas concentrações, quando presentes em concentrações elevadas, tornam-se tóxicas e prejudiciais (Ho et al., 2020). Isso, por sua vez, está relacionado à inflamação, que pode levar a alterações na estrutura das proteínas, à apoptose celular e à liberação de citocinas inflamatórias (Nakai and Tsuruta, 2021).

No processo inflamatório, diversas células são ativadas, incluindo os macrófagos, o que resulta em um aumento na produção de mediadores inflamatórios, tais como NO, $\text{O}_2^{\cdot-}$, IL-6, TNF- α , entre outros (Man et al., 2022). A produção de radicais livres, como o NO e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, constitui-se de um processo contínuo e fisiológico para manter a homeostase, contribuindo com os mecanismos de defesa do organismo, porém em excesso podem comprometer as funções celulares (Man et al., 2022). O desequilíbrio entre esses radicais contribui no processo de envelhecimento, disfunção mitocondrial, e estímulo à diferentes eventos patológicos como a inflamação (Papaccio et al., 2022).

Neste contexto, as atividades anti-inflamatórias *in vitro* dos extratos obtidos de *C. canephora* são especialmente promissoras, devido à sua capacidade de inibir a produção de NO, $\text{O}_2^{\cdot-}$, e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Esses resultados abrem novas oportunidades para a contínua busca e exploração sustentável de novos extratos de plantas com reconhecidas propriedades farmacoterapêuticas, com o *C. canephora*. Lemos et al. (2022) já demonstraram que os extratos etanólicos dos grãos de *C. canephora* foram capazes de inibir a produção de NO e $\text{O}_2^{\cdot-}$. Guidoni et al. (2023) empregando cultura de células-tronco de vegetais em suspensão de *C. canephora*

também observaram diminuição significativa na produção de NO, O₂⁻, IL-6 e TNF- α em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

As citocinas inflamatórias, quando associadas ao estresse oxidativo, podem intensificar a degradação da matriz extracelular e a transdução de sinalização pró-inflamatória. Esse processo pode favorecer o envelhecimento precoce da pele e atrasar o processo de reparo tecidual. O estresse oxidativo e a inflamação crônica podem desencadear uma série de eventos que contribuem para o envelhecimento da pele, incluindo a quebra de colágeno e elastina, o acúmulo de danos celulares e a redução na capacidade de regeneração da pele (Man et al., 2022; Papaccio et al., 2022). Portanto, a modulação adequada desses processos observada, especialmente pelos extratos elicitados com MJ podem reduzir o ambiente de estresse oxidativo intracelular e o processo inflamatório, contribuindo para a manutenção da integridade e o reparo tecidual (dos Santos Gramma et al., 2016; Guidoni et al., 2022, 2019).

A saúde e a integridade da pele são mantidas por meio de diversos fatores celulares e moleculares. Os fibroblastos desempenham um papel fundamental nesse processo, incluindo o aumento da produção de colágeno, a síntese de componentes da matriz extracelular e a contribuição para o reparo tecidual. Qualquer disfunção nessas células pode ter um impacto adverso na aparência e na função da pele (Nilforoushzadeh et al., 2022). Estudos tem evidenciado a importância dos fibroblastos. Extratos de *Calendula officinalis* promoveram a cicatrização de feridas, estimulando a proliferação e migração de fibroblastos (Dinda et al., 2015; Fronza et al., 2009). *Panax ginseng* conhecido por suas propriedades anti-envelhecimento teve seus efeitos atribuídos a sua capacidade estimular a produção de colágeno e elastina na pele pelos fibroblastos, e inibir a produção e secreção de metaloproteinase (Hwang et al., 2017). Estudo de Bimente et al. (2011) com extratos de células-tronco de *Coffea bengalensis* demonstrou que foi possível induzir a síntese de colágeno em fibroblastos e reduzir as EROs intracelulares, indicando proteção das células, ativando mecanismos de hidratação, firmeza e preenchimento, melhorando a qualidade da pele e com efeitos antirrugas. Recentemente, estudo realizado com extrato de células-tronco vegetal em suspensão de *C. canephora*, também demonstrou efeitos estimulantes *in vitro* sobre a proliferação e migração de fibroblastos (Guidoni et al., 2023). Os mesmos autores, desenvolveram uma formulação lipossomal contendo 5% deste extrato que apresentou uma importante capacidade reparadora tecidual *in vivo* modulando o processo inflamatório, estresse oxidativo e estimulando a produção de colágeno (Guidoni et al., 2022). Os resultados do presente estudo evidenciaram que

os extratos de calos de *C. canephora* demonstraram ter um efeito estimulante significativo na proliferação e migração de fibroblastos. Portanto, esses extratos podem ser considerados uma estratégia relevante no desenvolvimento de produtos de aplicação tópica, contribuindo assim para a promoção da manutenção e reparo tecidual.

6. CONCLUSÕES

Os ECCC apresentaram concentrações elevadas de metabólitos primários, tais como proteínas, assim como metabólitos secundários, incluindo fenólicos totais e flavonoides. É notável que o extrato MJ, comprovadamente eficaz na promoção da síntese desses compostos bioativos, pode, conseqüentemente, aprimorar as propriedades farmacológicas investigadas *in vitro* neste estudo.

Os ECCC demonstraram a capacidade de reduzir o estresse oxidativo ao eliminar os radicais livres, uma vez que essas propriedades biológicas podem ser associadas aos compostos fenólicos e flavonoides presentes. Além disso, os ECCC inibiram a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), evidenciando seu papel na modulação de processos inflamatórios e estresse oxidativo.

Os ECCC também demonstraram ter uma ação estimuladora sobre os fibroblastos, promovendo tanto a proliferação quanto a migração dessas células. Isso sugere que esses compostos podem desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas, no rejuvenescimento da pele e na prevenção ou reparo de danos teciduais durante o processo de envelhecimento cutâneo, contribuindo assim para a manutenção da integridade e saúde da pele.

Assim, este estudo apresenta, pela primeira vez com sucesso, evidências de que os ECCC, especialmente quando induzidos com MJ, demonstraram propriedades biológicas notáveis, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórias, e a capacidade de estimular a proliferação e migração de fibroblastos. Esses efeitos benéficos podem ser atribuídos ao acúmulo de compostos bioativos, como fenólicos totais e flavonoides. Portanto, os ECCC representam um promissor potencial biotecnológico como novas fontes naturais de matéria-prima a serem desenvolvidas em bioprodutos cosméticos e farmacêuticos, contribuindo assim para a promoção da saúde cutânea.

7. AGRADECIMENTOS

Esse estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

8. REFERÊNCIAS

- Abdulhafiz, F., Mohammed, A., Reduan, M.F.H., Kari, Z.A., Wei, L.S., Goh, K.W., 2022. Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. *Arab. J. Chem.* 15, 104161.
<https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2022.104161>
- Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., Ademoyegun, O.T., 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African J. Biotechnol.* 8, 3782–3788.
<https://doi.org/10.4314/ajb.v8i16.62060>
- Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A.M., Nunan, E.A., Glória, M.B.A., 2006. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8738–8743.
<https://doi.org/10.1021/jf0617317>
- Babova, O., Occhipinti, A., Maffei, M.E., 2016. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry* 123, 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.016>
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D.A., 2014. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 19, 13541–13563.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES190913541>
- Bayr, H., 2005. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* 33, S498–S501.
<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>
- Begashaw, B., Mishra, B., Tsegaw, A., Shewamene, Z., 2017. Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 337.
<https://doi.org/10.1186/s12906-017-1841-x>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bimente, M., Carola, A., Tito, A., Barbulova, A., Carucci, F., Apone, F., Monoli, I.,

- Cucchiara, M., Hill, J., Colucci, G., 2011. *Coffea bengalensis* for antiwrinkle and skin toning applications. *Cosmet. Toilet.* 126, 644–650.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Biswas, S.K., 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Buranasudja, V., Rani, D., Malla, A., Kobtrakul, K., Vimolmangkang, S., 2021. Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Sci. Rep.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92958-7>
- Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Cai, J., Ma, Y., Hu, P., Zhang, Y., Chen, J., Li, X., 2017. Elicitation of furanocoumarins in *Changium smyrnioides* suspension cells. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 130, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1199-2>
- Cardoso, J.C., Oliveira, M.E.B. de, Cardoso, F. de C.I., 2019. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Hortic. Bras.* 37, 124–132. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620190201>
- Chen, X., 2019. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1008–1025. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546667>
- de Christo Scherer, M.M., Marques, F.M., Figueira, M.M., Peisino, M.C.O., Schmitt, E.F.P., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2019. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress *in vitro*. *J. Tissue Viability* 28, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.02.003>
- de Lima Cherubim, D.J., Buzanello Martins, C.V., Oliveira Fariña, L., da Silva de Lucca, R.A., 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J. Cosmet. Dermatol.* 19, 33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>
- Depaula, J., Farah, A., 2019. Caffeine Consumption through Coffee: Content in the Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. *Beverages* 2019, Vol. 5, Page

- 37 5, 37. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES5020037>
- Dinda, M., Dasgupta, U., Singh, N., Bhattacharyya, D., Karmakar, P., 2015. PI3K-Mediated Proliferation of Fibroblasts by *Calendula officinalis* Tincture: Implication in Wound Healing. *Phyther. Res.* 29, 607–616. <https://doi.org/10.1002/ptr.5293>
- dos Santos Gramma, L.S., Marques, F.M., Vittorazzi, C., de Andrade, T.A.M., Frade, M.A.C., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2016. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 190, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.050>
- Efferth, T., 2019. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* 5, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Esquivel-Alvarado, D., Muñoz-Arrieta, R., Alfaro-Viquez, E., Madrigal-Carballo, S., Krueger, C.G., Reed, J.D., 2020. Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical *Vaccinium* Species from Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* 68, 2872–2879. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B01451>
- Farag, M.A., Mekky, H., El-Masry, S., 2016. Metabolomics driven analysis of *Erythrina lysistemon* cell suspension culture in response to methyl jasmonate elicitation. *J. Adv. Res.* 7, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.07.002>
- Fehér, A., 2019. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Front. Plant Sci.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., Merfort, I., 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula extracts* using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 126, 463–467. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.014>
- Giri, C.C., Zaheer, M., 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 126, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0985-6>
- Guidoni, M., de Sousa Júnior, A.D., Aragão, V.P.M., de Melo Costa Pereira, T., dos Santos, W.C., Monteiro, F.C., Guimarães, M.C.C., Fronza, M., 2022. Liposomal stem cell extract formulation from *Coffea canephora* shows outstanding anti-

- inflammatory activity, increased tissue repair, neocollagenesis and neoangiogenesis. Arch. Dermatol. Res. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02388-2>
- Guidoni, M., Figueira, M.M., Ribeiro, G.P., Lenz, D., Grizotto, P.A., de Melo Costa Pereira, T., Scherer, R., Bogusz, S., Fronza, M., 2019. Development and evaluation of a vegetable oil blend formulation for cutaneous wound healing. Arch. Dermatol. Res. 311, 443–452. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01919-8>
- Guidoni, M., Sousa Júnior, A.D. de, Aragão, V.P.M., E Silva, M.V.T., Barth, T., Clarindo, W.R., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2023. Plant stem cell extract from *Coffea canephora* shows antioxidant, anti-inflammatory, and skin regenerative properties mediated by suppression of nuclear factor- κ B. Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol. 56, e12849. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12849>
- Ho, T.-T., Murthy, H.N., Park, S.-Y., 2020. Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. Int. J. Mol. Sci. 21, 716. <https://doi.org/10.3390/ijms21030716>
- Ho, T.T., Lee, J. Du, Jeong, C.S., Paek, K.Y., Park, S.Y., 2018. Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8629-2>
- Hwang, E., Park, S.-Y., Yin, C.S., Kim, H.-T., Kim, Y.M., Yi, T.H., 2017. Antiaging effects of the mixture of *Panax ginseng* and *Crataegus pinnatifida* in human dermal fibroblasts and healthy human skin. J. Ginseng Res. 41, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.01.001>
- Jung, S., Kim, M.H., Park, J.H., Jeong, Y., Ko, K.S., 2017. Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. J. Med. Food 20, 626–635. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3935>
- Kamarul Zaman, M.A., Azzeme, A.M., Ramle, I.K., Normanshah, N., Ramli, S.N., Shahrudin, N.A., Ahmad, S., Abdullah, S.N.A., 2020. Induction, Multiplication, and Evaluation of Antioxidant Activity of *Polyalthia bullata* Callus, a Woody Medicinal Plant. Plants 9, 1772. <https://doi.org/10.3390/plants9121772>
- Kapoor, S., Raghuvanshi, R., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S., Chaurasia, O.P., 2018. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 183, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.018>

- Khochapong, W., Ketnawa, S., Ogawa, Y., Punbusayakul, N., 2021. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chem.* 348, 129094. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129094>
- Kim, S.-K., Jin, Y.-S., Choi, I.-G., Park, Y.-C., Seo, J.-H., 2015. Enhanced tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple lignocellulose-derived inhibitors through modulation of spermidine contents. *Metab. Eng.* 29, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.004>
- Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S.Y., Teraoka, R., 2011. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 793–796. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.793>
- Kotha, R.R., Tareq, F.S., Yildiz, E., Luthria, D.L., 2022. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on *In Vitro* Antioxidant Assays. *Antioxidants* 11, 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Krishnan, V., Ahmad, S., Mahmood, M., 2015. Antioxidant Potential in Different Parts and Callus of *Gynura procumbens* and Different Parts of *Gynura bicolor*. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/147909>
- Lemos, M.F., de Andrade Salustriano, N., de Souza Costa, M.M., Lirio, K., da Fonseca, A.F.A., Pacheco, H.P., Endringer, D.C., Fronza, M., Scherer, R., 2022. 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. *J. Saudi Chem. Soc.* 26, 101467. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101467>
- Lemos, Mayara Fumiere, Lemos, Mariana Fumiere, Pacheco, H.P., Guimarães, A.C., Fronza, M., Endringer, D.C., Scherer, R., 2017. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind. Crops Prod.* 95, 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.008>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P., 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* Volume 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lindley, L.E., Stojadinovic, O., Pastar, I., Tomic-Canic, M., 2016. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 138, 18S-28S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002682>

- Lorençoni, M.F., Silva, R.S., Azevedo Júnior, R., Fronza, M., 2021. Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk. *Rev. Paul. Pediatr.* 39. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2021/39/2019165>
- Lucho, S.R., do Amaral, M.N., López-Orenes, A., Kleinowski, A.M., do Amarante, L., Ferrer, M.Á., Calderón, A.A., Braga, E.J.B., 2019. Plant Growth Regulators as Potential Elicitors to Increase the Contents of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Stevia Plants. *Sugar Tech* 21, 696–702. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0673-4>
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., Palomo, I., 2019. Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. *Molecules* 24, 366. <https://doi.org/10.3390/molecules24020366>
- Man, M.-Q., Wakefield, J.S., Mauro, T.M., Elias, P.M., 2022. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Inflammation* 45, 949–964. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01615-8>
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y., Jeong, B., 2016. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 399. <https://doi.org/10.3390/ijms17030399>
- Miastkowska, M., Sikora, E., 2018. Anti-Aging Properties of Plant Stem Cell Extracts. *Cosmetics* 5, 55. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040055>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakai, K., Tsuruta, D., 2021. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10799. <https://doi.org/10.3390/ijms221910799>
- Napavichayanun, S., Aramwit, P., 2017. Effect of animal products and extracts on wound healing promotion in topical applications: a review. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 28, 703–729. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1301772>
- Nazir, F., Javed, S., Nazir, A., Hussain, T., Abid, S., 2022. Natural plant extract-treated bioactive textiles for wound healing, in: *Medical Textiles from Natural Resources*. Elsevier, pp. 137–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90479-7.00007-5>

- Nigra, A.D., de Almeida Bauer Guimarães, D., Prucca, C.G., Freitas-Silva, O., Teodoro, A.J., Gil, G.A., 2021. Antitumor Effects of Freeze-Dried Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Extracts on Breast Cancer Cell Lines. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/5572630>
- Nilforoushzadeh, M.A., Khodaverdi Darian, E., Afzali, H., Amirkhani, M.A., Razzaghi, M., Naser, R., Amiri, A.B., Alimohammadi, A., Nikkhat, N., Zare, S., 2022. Role of Cultured Skin Fibroblasts in Regenerative Dermatology. *Aesthetic Plast. Surg.* 46, 1463–1471. <https://doi.org/10.1007/s00266-022-02940-5>
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M.O., Jin, Y.-W., Lee, E.-K., Loake, G.J., 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep.* 49, 149–158. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>
- Okuma, C.H., Andrade, T.A.M., Caetano, G.F., Finci, L.I., Maciel, N.R., Topan, J.F., Cefali, L.C., Polizello, A.C.M., Carlo, T., Rogerio, A.P., Spadaro, A.C.C., Isaac, V.L.B., Frade, M.A.C., Rocha-Filho, P.A., 2015. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. *Eur. J. Pharm. Sci.* 71, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.016>
- Ozyigit, I.I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I.E., Cabi, E., Kaya, Y., 2023. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>
- Papaccio, F., D'Arino, A., Caputo, S., Bellei, B., 2022. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants* 11, 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox11061121>
- Phan, D.T.A., Ha, H.T., Ho, T.T., 2021. An Extract and Fractions from *Coffea arabica* Sediment on Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities, and on the Quality of Whiteleg Shrimp (*Litopenaus vannamei*) during Refrigerated Storage. *Prev. Nutr. Food Sci.* 26, 346–356. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.3.346>
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pinheiro, F. de A., Elias, L.F., de Jesus Filho, M., Modolo, M.U., Rocha, J. de C.G., Lemos, M.F., Scherer, R., Cardoso, W.S., 2021. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. *Food Chem.* 336, 127701.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127701>
- Rahman, M.M., Rahaman, M.S., Islam, M.R., Rahman, F., Mithi, F.M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M.A., Alghamdi, S.Q., Alruwaili, A.S., Hossain, M.S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, Uddin, M.S., 2021. Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules* 27, 233. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.09.006>
- Rezende, J.C. de, Carvalho, C.H.S. de, Santos, A.C.R., Pasqual, M., Teixeira, J.B., 2012. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Sci. Agron.* 34, 93–98. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i1.11230>
- Rodrigues, N.P., Salva, T.D.J.G., Bragagnolo, N., 2015. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the *in Vitro* Capacity To Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4815–4826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00530>
- Sanglard, N.A., Amaral-Silva, P.M., Sattler, M.C., de Oliveira, S.C., Nunes, A.C.P., Soares, T.C.B., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., 2017. From chromosome doubling to DNA sequence changes: outcomes of an improved *in vitro* procedure developed for allotriploid “Híbrido de Timor” (*Coffea arabica* L. × *Coffea canephora* Pierre Sanglard, N.A., Amaral-Silva, P.M., Sattler, M.C., de Oliveira, S.C., N. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 131, 223–231. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1278-4>
- Santos, C.G. dos, Paiva, R., Paiva, P.D. de O., Paiva, E., 2008. Induction and biochemical analysis of callus from leaf and nodal segments of *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. *Magistra* 20, 22–29.
- Santos, M.R.A. dos, Lima, R.A., Ferreira, M. das G.R., Rocha, J.F., Espíndula, M.C., Alves, E.A., 2014. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Coffea canephora*. *J. Biotechnol. Biodivers.* 5, 12–19.
- Sharma, Sakshi, Sharma, Shivika, Kukreja, S., Jadon, V.S., Sharma, V., 2020. Plant Tissue Culture Methods in Secondary Metabolite Production-A Mini Review.

Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 21.

- Soares, A.K.C., de Sousa Júnior, A.D., Lorençoni, M.F., de Castro, J.A., de Araujo Porto, F.V., Pessoa, I.S., Silva, M.V.T. e., Pereira, A.C.H., de Souza Andrade Moraes, F., de Andrade, T.U., Endringer, D.C., Scherer, R., Barth, T., Fronza, M., 2021. *In vitro* and in vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of *Renealmia petasites* Gagnep. *Inflammopharmacology* 29, 451–465. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00786-4>
- Solano, F., 2020. Metabolism and Functions of Amino Acids in the Skin, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp. 187–199. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45328-2_11
- Umeda, M., Ikeuchi, M., Ishikawa, M., Ito, T., Nishihama, R., Kyojuka, J., Torii, K.U., Satake, A., Goshima, G., Sakakibara, H., 2021. Plant stem cell research is uncovering the secrets of longevity and persistent growth. *Plant J.* 106, 326–335. <https://doi.org/10.1111/tpj.15184>
- Venial, L.R., Mendonça, M.A.C., Amaral-Silva, P.M., Canal, G.B., Passos, A.B.R. de J., Ferreira, A., Soares, T.C.B., Clarindo, W.R., 2020. Autotetraploid *Coffea canephora* and Auto-Alloctaploid *Coffea arabica* From *In Vitro* Chromosome Set Doubling: New Germplasms for Coffea. *Front. Plant Sci.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00154>
- Wang, J., Li, Jian-li, Li, Jing, Li, Jin-xin, Liu, S., Huang, L., Gao, W., 2017. Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herb. Med.* 9, 115–125. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(17\)60085-6](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60085-6)
- Xu, B.J., Chang, S.K.C., 2007. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *J. Food Sci.* 72, S159–S166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Yazdanian, E., Golkar, P., Vahabi, M.R., Taghizadeh, M., 2022. Elicitation Effects on Some Secondary Metabolites and Antioxidant Activity in Callus Cultures of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse.: Methyl Jasmonate and Putrescine. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 194, 601–619. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03643-4>
- Yue, W., Ming, Q., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.-J., Han, T., Qin, L., 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 215–232. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>

Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33–42.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

Zhou, T., Wang, P., Gu, Z., Ma, M., Yang, R., 2020. Spermidine improves antioxidant activity and energy metabolism in mung bean sprouts. *Food Chem.* 309, 125759.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125759>