

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO DE CÉLULAS-TRONCO VEGETAIS EM SUSPENSÃO
DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner**

FLAVIA VITORINO DE ARAUJO PORTO

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO/2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO DE CÉLULAS-TRONCO VEGETAIS EM SUSPENSÃO
DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do
grau de Mestra em Ciências
Farmacêuticas.

FLAVIA VITORINO DE ARAUJO PORTO

VILA VELHA-ES
FEVEREIRO/2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P839a Porto, Flavia Vitorino de Araujo.
Atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato de células-tronco vegetais em suspensão de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner Orientador / Flavia Vitorino de Araujo Porto . – 2023.
55 f. : il.

Orientador: Marcio Fronza.
Coorientador: Victor Paulo Mesquita Aragão
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2023.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Café. 3. antioxidante.
4. Células-tronco. I. Fronza, Márcio. II. Aragão, Victor Paulo Mesquita. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

FLAVIA VITORINO DE ARAUJO PORTO

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO
DE CÉLULAS-TRONCO VEGETAIS EM SUSPENSÃO DE *Coffea*
canéfora Pierre ex A. Froehner**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora:

Ellen de Moura Vale

Profa. Dra. Ellen de Moura Vale (UENF)

Rodrigo Scherer

Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)

Victor Paulo Mesquita Aragão

Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão (ICCA/UVV)

Coorientador

Marcio Fronza

Prof. Dr. Marcio Fronza (Universidade Vila Velha)
Orientador

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	<i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner.....	12
1.2.	Cultura de tecidos vegetais	13
1.3.	Célula-tronco vegetal: Cultura de calos e suspensões celulares	14
1.4.	Metabólitos primários e secundários	16
1.5.	Estresse oxidativo e o papel da atividade antioxidante	18
1.6.	Processo inflamatório	20
1.7.	Envelhecimento cutâneo	21
1.8.	Hipótese	22
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.....	23
3.3.	Indução de calos	23
3.4.	Cultura de células-tronco vegetais em suspensões celulares	24
3.5.	Obtenção dos extratos vegetais	24
3.6.	Quantificação de proteínas.....	25
3.7.	Análise de aminoácidos.....	25
3.9.	Quantificação de polifenóis totais	26
3.10.	Quantificação de flavonoides	26
3.11.	Ensaio químico de atividade antioxidante	26
3.12.	Estudos da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	27
3.13.	Efeito preventivo contra danos oxidativos em L929 causados por H ₂ O ₂	27
3.14.	Determinação de óxido nítrico <i>in vitro</i>	27
3.15.	Redução da produção do ânion superóxido	28
3.16.	Determinação de citocinas <i>in vitro</i>	28
3.17.	Estudo do efeito dos extratos sobre a proliferação celular	29
3.18.	Efeito dos extratos na migração de fibroblastos	29
3.19.	Análise estatística.....	30

4.	RESULTADOS	30
4.1.	Obtenção dos extratos vegetais	30
4.2.	Quantificação de proteínas.....	30
4.3.	Análise de aminoácidos.....	31
4.5.	Quantificação de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante	35
4.6.	Estudos da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	36
4.7.	Efeito preventivo contra danos oxidativos em L929 causados por H ₂ O ₂	36
4.8.	Redução da produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	38
4.9.	Redução da produção do ânion superóxido <i>in vitro</i>	38
4.10.	Redução da produção de citocinas <i>in vitro</i>	39
4.11.	Proliferação de fibroblastos <i>in vitro</i>	40
4.12.	Efeito dos extratos na migração celular <i>in vitro</i>	41
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO.....	47
7.	AGRADECIMENTOS	48
8.	REFERÊNCIAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	ESMS – Extrato suspensão meio simples
ABTS ⁺ – 2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)	FRAP – Poder antioxidante de redução férrica;
ANOVA – Análise de Variância	IC ₅₀ – Concentração do extrato requerida para reduzir a quantidade de radicais livres por 50%
BAP – Benzilaminopurina	IL-10 – Interleucina 10
BOD – Demanda bioquímica de oxigênio	IL-6 – Interleucina 6
DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole	IL-8 – Interleucina 8
DMSO – Dimetilsulfóxido	LPS – Lipopolissacarídeo
DP – Desvio padrão	MTT – (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil	NBT – Cloreto de Nitroazul de Tetrazólio
DTT – DL-Dithiothreitol	NO – Óxido Nítrico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético	OPD – O-Phenilenediamina
EGTA – Ácido tetraacético etileno glicol-bis (2-aminoetilether)-N,N,N',N'	PBS – Tampão fosfato-salino
ELISA – Ensaio Imunoenzimático	PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
EROs – Espécies reativas de oxigênio	TMB – Tetrametilbenzidina
ESMC – Extrato suspensão meio composto	TNF α – Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de proteínas totais extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de <i>C. canephora</i>	24
Tabela 2. Quantificação de aminoácidos dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de <i>C. canephora</i>	25
Tabela 3. Compostos preliminares identificados nos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de <i>C. canephora</i>	29
Tabela 4. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de <i>C. canephora</i>	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** APCI-MS negativo representativo para os extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora*.....27
- Figura 2.** APCI-MS positivo representativo para os extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora*.....28
- Figura 3.** Efeito protetor dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora* avaliado em fibroblastos L929 contra danos causados por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações de amostra na presença ou ausência de H₂O₂. Catalase a 10 UI/mL (CAT) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) em relação ao controle negativo sem H₂O₂. *Significativo (p < 0,05) em relação ao controle de H₂O₂ por ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Tukey.....31
- Figura 4.** Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na produção óxido nítrico (NO). Macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostra e estimulado com LPS (1 µg/mL). L-NIL a 30 µg/mL foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) comparado ao controle negativo sem LPS. *Significativo (p < 0,05) comparado ao controle com células induzidas por LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.32
- Figura 5.** Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na produção do radical superóxido (O₂^{•-}). Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostra e estimulado com LPS após 30 min. Tempol 10 µM (TPL) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) em relação ao controle negativo sem LPS. * Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle com células induzidas por LPS por via unidirecional ANOVA seguida de teste post hoc de Tukey.....33

Figura 6. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora* sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias TNF- α . Macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostras na presença ou ausência de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle negativo sem LPS. * Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle com células induzidas por LPS por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey.....34

Figura 7. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora* na proliferação de fibroblastos. Os resultados foram expressos como a absorbância no comprimento de onda de 450 nm e são expressos como a média \pm DP (n = 3). #Controle negativo *Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.....34

Figura 8. Influência dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na proliferação e/ou migração de L929 fibroblastos no ensaio de raspagem. **A)** porcentagem do número total de células na área da raspagem após 14 h de incubação (37 °C a 5% CO₂) sem (controle) ou com ESMS e ESMC a 0,1, 10 e 1000 μ g/mL e PDGF 2 ng/mL (controle positivo). **B)** Imagem representativa do microscópio ilustrando a ferida celular imediatamente após a lesão (zero arranhão 0 h) e após 14 h pós-tratamento, conforme indicado em cada painel. As barras representam a média \pm SD de três independentes experimentos. (p < 0,05) indica diferenças significativas em comparação com células não tratadas (controle); # (p < 0,05), em comparação com PDGF.....35

RESUMO

Porto, Flavia Vitorino de Araujo, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2023. **ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE CÉLULAS-TRONCO VEGETAIS EM SUSPENSÃO DE *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner** Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza. Coorientador: Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão.

O estado do Espírito Santo é o maior produtor de *Coffea canephora* do país. Além do alto valor econômico agregado a bebida, o café apresenta diversas propriedades biológicas benéficas a saúde, com destaque para a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e fotoprotetora. Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais tem demonstrado ser uma aliada na produção de metabólitos primários e secundários sem a interferência dos fatores ambientais, permitindo a produção constante destes compostos bioativos de interesse. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição química e avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e o efeito na proliferação e migração de fibroblastos *in vitro* em extratos de células-tronco vegetais oriundos de suspensões celulares obtidos a partir de folhas de *C. canephora*. A coleta do material vegetal foi realizada na Fazenda São Luiz, no município de Muqui-ES. As folhas foram desinfestadas, inoculadas *in vitro* para indução de calos em dois meios de cultura distintos e, posteriormente, deram origem as suspensões celulares. Os extratos de células-tronco vegetais em suspensão foram caracterizados quanto ao seu perfil de aminoácidos por cromatografia de troca iônica, teor de fenólicos e flavonoides totais por métodos colorimétricos e sua composição química preliminar por espectrometria de massas. A atividade antioxidante foi avaliada por diferentes métodos químicos (ABTS, DPPH, FRAP e O₂). A inibição da produção do ânion superóxido (O₂⁻), óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral (TNF-α) foram avaliadas em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). Por fim, o efeito na proliferação e migração de fibroblastos foram avaliados pelos ensaios de *scratch* e BrDU. Os resultados evidenciaram que os extratos apresentaram uma composição de aminoácidos diversificada, com destaque para a glicina e prolina, além de um teor relevante de compostos fenólicos corroborando com a promissora atividade antioxidante observada no método FRAP apresentado valores de 3,96 ± 0,19 µg/mL e 7,35 ± 0,21 µg/mL para os extratos investigados. Não obstante, os extratos demonstraram excelente viabilidade celular e importante atividade anti-inflamatória. Além disso, também demonstraram eficiente ação estimuladora de fibroblastos, aumentando a migração e a proliferação dessas células. Os resultados obtidos, contribuem para elucidação das propriedades biológicas presentes em células-tronco de café, além de trazer novas possibilidades para aplicações nas áreas farmacêuticas e cosmética. Além disto, este trabalho caracteriza-se como inédito para a espécie, onde pela primeira vez foi descrito o perfil de aminoácidos presentes em suspensões celulares de *C. canephora*.

Palavras-chaves: café conilon, cultivo *in vitro*, células-tronco, antioxidante, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Porto, Flavia Vitorino de Araujo, M.Sc, Vila Velha University – ES, February 2023.
ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF PLANT STEM CELL EXTRACT IN *Coffea canephora* SUSPENSION Pierre ex A. Froehner
Advisor: Prof. Dr. Marcio Fronza. Co-advisor: Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão

The state of Espírito Santo is the largest producer of *Coffea canephora* in the country. In addition to the high economic value added to the beverage, coffee has several biological properties that are satisfactory for health, with emphasis on antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and photoprotective activity. In this context, plant tissue culture has been shown to be an ally in the production of secondary metabolites without the interference of environmental factors, allowing the production of bioactive compounds of interest, with constant yield and high quality. The objective of this work was to determine the chemical composition and evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities and the effect on the external and migration of fibroblasts in vitro in plant stem cell extracts originating from cell suspensions obtained from *C. canephora* leaves. The collection of plant material was carried out at Fazenda São Luiz, in the municipality of Muqui-ES. The leaves were disinfested, inoculated in vitro for callus induction in two different culture media, and subsequently originated cell suspensions. Plant stem cell extracts in suspension were characterized for their amino acid profile by ion exchange chromatography, total phenolic and flavonoid content by colorimetric methods, and their preliminary chemical composition by mass spectrometry. The antioxidant activity was evaluated by different chemical methods (ABTS, DPPH, FRAP and O₂). The continued production of superoxide anion (O₂^{•-}), nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF-α) were evaluated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. Finally, the effect on fibroblast perspective and migration was evaluated by scratch and BrDU assays. The results showed that the extracts had a diverse composition of amino acids, with emphasis on glycine in the ESMS and proline in the ESMC, in addition to a relevant content of phenolic compounds, corroborating the promising antioxidant activity observed in the FRAP method, in which to inhibit 50% of free radicals, only 3.96 ± 0.19 µg/mL of ESMS and 7.35 ± 0.21 µg/mL of ESMC were required. Nevertheless, the extracts demonstrated excellent cell viability and important anti-inflammatory activity. In addition, it also boosted an efficient stimulatory action of fibroblasts, increasing the migration and differentiation of these cells.

Keywords: conilon coffee, in vitro culture, stem cells, antioxidant, anti-inflammatory.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner

A história do café na América Latina começou no início do século XVIII no Caribe e rapidamente nas décadas seguintes o café se difundiu pelas regiões tropicais das Américas, incluindo o Brasil que se destaca na produção desde o século XIX (MCCOOK, 2017).

O café é uma planta arbustiva pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* que abrange atualmente, 124 espécies (DAVIS et al., 2019; HAMON et al., 2017). Dentre as espécies catalogadas destacam-se *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (café conilon e robusta) sobretudo por proporcionarem melhor qualidade sensorial à bebida frente as outras espécies do gênero (LEMOS et al., 2020). Neste sentido, estas espécies são responsáveis pela maior parte da produção de todo o café consumido no mundo, sendo ambas de grande relevância econômica (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015). Em adição, as demais espécies do gênero *Coffea* também são importantes, uma vez que são utilizadas predominantemente para o melhoramento genético das culturas de *C. arabica* e *C. canephora*, buscando tornar estas plantas mais resistentes a pragas, doenças e condições ambientais adversas (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015).

Quanto ao cultivo do café, na América Latina ele ocorre em um mosaico de terras tropicais e subtropicais, abrangendo desde o Sul do Brasil ao Norte do México, estando presente ainda do Oeste do Peru até o Leste de Porto Rico (MCCOOK, 2017). No Brasil, o café é um dos principais produtos agrícolas apresentando grande relevância no mercado nacional e internacional, visto que o país é o maior produtor e exportador desta *commodity* no mundo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021a). Dados recentes mostram que a produção nacional engloba tanto os grãos de *C. arabica* que representa cerca de 70%-75%, quanto os grãos de *C. canephora* representando, aproximadamente, 25-30% de toda exportação nacional (VENIAL et al., 2020).

O estado do Espírito Santo contribui significativamente para a produção de café no Brasil, sendo o segundo maior produtor deste grão no país, e o maior produtor de *C. canephora* do Brasil, contribuindo com cerca de 67% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021b). Por sua

vez, o Norte do estado se destaca no cultivo das variedades de *C. canephora* por serem regiões de baixas altitudes e de temperaturas mais altas (FERRÃO et al., 2017).

Além de ser uma bebida de grande valor econômico agregado, o café possui inúmeros compostos químicos que influenciam não somente no aroma e sabor (LEMOS et al., 2020), mas também são responsáveis por atribuírem diversas propriedades biológicas que podem estar presentes desde os grãos até as folhas (CHEN, 2019). A presença de fitoquímicos, como compostos fenólicos e alcaloides em *C. arabica* e *C. canephora* estão associados a propriedades biológicas, tais como, atividade antioxidante (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015), anti-inflamatória (JUNG et al., 2017), antitumoral (NIGRA et al., 2021), fotoprotetora (WAGEMAKER et al., 2011), dentre outras. Este potencial biotecnológico para a produção de compostos biologicamente ativos, tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética. Neste sentido, a cultura de tecidos vegetais destaca-se como uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada na busca e produção de metabólitos primários e secundários de interesse terapêutico.

1.2. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de células e tecidos vegetais consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em condições controladas de assepsia e fatores ambientais, tais como temperatura, luz, umidade e meios de cultivo apropriados (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009). Nesta técnica, são utilizados explantes, ou seja, pequenos fragmentos de tecidos vegetais que quando submetidos ao processo de assepsia podem ser introduzidos *in vitro*, em ambiente totalmente controlado para produzir novas plântulas, brotações ou calos, em uma área reduzida e em curto período de tempo (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009). Assim, o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* a partir de tecidos vegetais, são responsáveis por muitas aplicações práticas na agricultura, tais como, regeneração de plantas por organogênese, embriogênese somática, propagação clonal, dentre outras, e se estabeleceu como ferramenta essencial para a engenharia genética de plantas (EVANS; COLEMAN; KEARNS, 2020).

Desde as primeiras civilizações a humanidade explora os recursos naturais, seja para alimentação ou como fonte de produtos medicinais (EFFERTH, 2019). Com a crescente demanda por produtos de origem natural, acompanhada da crescente destruição dos habitats naturais, a biotecnologia vegetal, em especial a cultura de tecidos vegetais, destaca-se como uma ferramenta inovadora para o cultivo de plantas potencialmente medicinais, uma vez que a síntese de metabólitos secundários pode ser favorecida pela possibilidade de produção em condições controladas e homogêneas, permitindo a biossíntese de compostos de interesse em larga escala e de maneira sustentável (EFFERTH, 2019).

A produção de metabólitos primários e secundários nas culturas *in vitro*, assim como em habitats naturais, pode variar. Nesse contexto, estratégias biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de otimizar e potencializar a produção destes metabólitos (OCHOA-VILLARREAL et al., 2016). Dentre estas possibilidades, pode-se incluir a otimização do ambiente de cultivo, meios de cultura, elicitación (agentes externos que promovem um aumento na síntese de compostos de interesse por estresse), e fornecimento de nutrientes específicos (OCHOA-VILLARREAL et al., 2016).

Além disso, dentre as possibilidades de produção de metabólitos, a biotecnologia vem desenvolvendo técnicas que oferecem diferentes vias para a produção de culturas *in vitro*, como a cultura de calos e suspensões celulares (EFFERTH, 2019). Entretanto, ainda que a cultura de tecidos seja uma técnica já utilizada para a produção de metabólitos, cada espécie requer necessidades específicas de cultivo para seu estabelecimento *in vitro* e conseqüentemente otimização das condições de produção de compostos de interesse (EFFERTH, 2019).

1.3. Célula-tronco vegetal: Cultura de calos e suspensões celulares

A cultura de tecidos vegetais tem se estabelecido como uma técnica importante tanto para a ciência quanto a nível econômico, uma vez que a cultura de calos e suspensões celulares são fontes alternativas para síntese de substâncias de origem vegetal com potencial terapêutico (BABICH et al., 2020; EFFERTH, 2019).

Calos são agregados celulares de aparência amorfa, textura friável, com coloração variando de incolor a tons de castanho-claro, oriundos de pequenos fragmentos de tecidos vegetais, que sofrem desdiferenciação formando uma massa celular em proliferação (FEHÉR, 2019). A principal característica dos calos é a sua totipotência celular, ou seja, a capacidade de se regenerar em qualquer tecido vegetal ou até mesmo em uma planta inteira, bem como sintetizar compostos que podem estar presentes desde as raízes até o fruto, uma vez que os calos abrigam todas as informações genéticas de uma planta inteira (EFFERTH, 2019; FEHÉR, 2019), sendo assim caracterizados como células-troco vegetais.

A cultura de calos, quando estabelecida em condições assépticas, cultivada em meio semi-sólido com nutrientes e hormônios vegetais específicos pode ser mantida indefinidamente *in vitro*, formando bancos de germoplasma. Uma vez que os calos friáveis são estabelecidos, estes podem ser transferidos para meio líquido que deve estar constantemente em agitação lenta, sendo chamados agora de cultura de células em suspensão, ou suspensões celulares (EFFERTH, 2019). Nas suspensões celulares, as células estão livres ou formam pequenos agregados, e assim como os calos, estas células em suspensão são totipotentes, portanto também são capazes de sintetizar os metabólitos secundários idênticos aos presentes na planta-mãe (YUE et al., 2016).

A produção de calos e suspensões celulares tem grande potencial para diversas aplicações, tais como, a síntese de metabólitos secundários para fins terapêuticos, a produção de plantas agrícolas por regeneração celular, produção de anticorpos terapêuticos e outras proteínas recombinantes, dentre outros compostos de interesse (EFFERTH, 2019).

Desta forma, através da cultura de tecidos vegetais, a produção *in vitro* de metabólitos secundários ocorre de maneira controlada e homogênea sem influência de fatores ambientais, estabelecendo uma padronização na produção dos compostos.

Nesse contexto, muitas vantagens podem ser observadas ao utilizar as técnicas de cultura de tecidos quando comparado a plantas no campo. Dentre estas vantagens, pode-se citar a possibilidade de produzir altas taxas de biomassa (BABICH et al., 2020), as culturas *in vitro* não são ameaçadas pelo ataque de microorganismos ou insetos (EFFERTH, 2019), a biomassa produzida

é livre de pesticidas, herbicidas, compostos radioativos ou outros poluentes (BABICH et al., 2020), a produção de metabólitos secundários não sofre a influência das variações bióticas e abióticas (EFFERTH, 2019) e ainda há uma vantagem ambiental, uma vez que a possibilidade de explorar os metabólitos secundários ocorre sem ameaçar espécies, visto que as culturas vegetais estabelecidas podem ser mantidas por longos períodos de tempo *in vitro* sem a necessidade de novas coletas (EFFERTH, 2019). Desta forma, calos e suspensões celulares são considerados uma alternativa sustentável de explorar os recursos naturais produzindo metabólitos secundários de interesse, com alto rendimento e controle de qualidade.

Assim, o café é uma planta com diversos compostos bioativos (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015), que podem estar presentes desde as folhas até os grãos (CHEN, 2019). Ainda que estudos a respeito da indução de calos envolvendo embriogênese somática, micropropagação e hibridização do café tenham sido realizados, há apenas um relato que demonstra a atividade biológica de células-tronco de *C. canephora* (GUIDONI, 2022). Contudo, as formas de cultivo para a prospecção de um extrato bioativo de células-tronco de *C. canephora* ainda precisam ser otimizadas com o objetivo de proporcionar melhor custo-benefício na produção.

1.4. Metabólitos primários e secundários

As plantas possuem dois tipos de metabolismo, que são conhecidos como metabolismo primário e secundário. As funções essenciais das plantas, como crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e reprodução são desempenhadas pelo metabolismo primário a partir dos processos de fotossíntese, síntese de aminoácidos e proteínas, absorção de nutrientes, entre outros (BÖTTGER et al., 2018). Por outro lado, o metabolismo secundário está associado a adaptação das plantas a fatores bióticos e abióticos provenientes do ambiente ao qual ela está inserida (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários compreendem uma diversidade de compostos químicos orgânicos de baixo peso molecular e estrutura complexa (GIRI; ZAHEER, 2016). Esses compostos desempenham funções de defesa química contra herbívoros e patógenos, sendo responsáveis por atribuir cor, odor e sabor às estruturas vegetais (BÖTTGER et al., 2018). Além disso, apresentam

ação protetora associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a raios ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais (YANG et al., 2018). Portanto, o conteúdo de metabólitos secundários varia de acordo com as condições ambientais as quais a planta é exposta.

Além de desempenharem funções ecológicas e fisiológicas nas plantas, o uso de metabólitos secundários a partir das plantas medicinais, está presente desde as primeiras civilizações e tem se mantido ao longo de gerações (BELTRESCHI; DE LIMA; DA CRUZ, 2019). Atualmente, os metabólitos secundários são considerados grandes fontes de compostos bioativos para produtos da indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (YANG et al., 2018).

O metabolismo secundário é originado a partir do metabolismo primário no processo de conversão de energia luminosa em energia química (TAIZ; ZEIGER, 2013). Em síntese, o metabolismo primário é precursor do metabolismo secundário, dando origem a rotas biossintéticas que permitem a formação de três principais grupos de metabólitos secundários que são os compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (KABERA et al., 2014). Dentre estes, destacam-se os compostos fenólicos, especialmente pelo seu potencial antioxidante, uma vez que são capazes de desempenhar um papel importante na neutralização de radicais livres. Em síntese, radicais livres são moléculas reativas causadoras de diversas doenças relacionadas, principalmente, ao dano oxidativo de componentes celulares, como o câncer, cardiopatias, doenças crônicas e até mesmo o envelhecimento precoce (ANANTHARAJU et al., 2016).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático com grupos hidroxila e podem ser divididos em três grandes grupos: os ácidos fenólicos, as chalconas e as cumarinas (DELGADO; ISSAOUI; CHAMMEM, 2019). Os ácidos fenólicos estão presentes de maneira abundante na espécie *C. canephora* representados pelos derivados dos ácidos hidroxicinâmico, como o ácido clorogênico e ácido cafeico, ambos, de acordo com o estudo de Rodrigues, Salva e Bragagnolo (2015), são responsáveis por atribuir capacidade antioxidante ao café.

Ainda que os metabólitos secundários sejam abundantes nos vegetais, a síntese desses compostos é dependente do estágio fisiológico da planta e de fatores bióticos e abióticos que afetam o rendimento e dificultam a exploração desse recurso de maneira regular e homogênea para a indústria farmacêutica,

alimentícia e cosmética. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais entra como aliada para otimizar a síntese de metabólitos secundários permitindo uma produção sustentável de alta qualidade e rendimento constante que atenda as demandas do mercado.

1.5. Estresse oxidativo e o papel da atividade antioxidante

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

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou de nitrogênio e as defesas antioxidantes, causando processos deletérios a nível celular (TURRENS, 2003). Por sua vez, as EROs são uma variedade de moléculas e radicais livres derivadas do oxigênio molecular que apresentam um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica (LIOU; STORZ, 2010; TURRENS, 2003). Essa característica confere um alto potencial de reatividade as EROs, tornando-os moléculas instáveis e capazes de transformar outras moléculas com as quais encontram.

As EROs são produzidas naturalmente pelos organismos vivos como resultado do alto consumo de oxigênio por alguns componentes celulares, como mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Entretanto, os radicais livres têm origem exógena a partir da poluição do ar e da água, luz ultravioleta, álcool, tabaco, entre outros (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Ainda que EROs estejam envolvidas em processos importantes do metabolismo celular, como reações enzimáticas, transporte de elétrons mitocondrial, ativação de fatores de transcrição nuclear, dentre outros (BAYR, 2005), o excesso de radicais livres está envolvido em muitas condições patológicas desde diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, câncer, asma, artrite reumatoide, inflamação e até o próprio processo de envelhecimento celular (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Ao se tratar da pele, as EROs são responsáveis por alterações importantes na matriz extracelular que induzem e aceleram o processo de envelhecimento cutâneo (GU et al., 2020; ZHANG; DUAN, 2018). Além disso, o aumento do estresse oxidativo nesse tecido favorece o surgimento de doenças de pele, sendo elas: dermatite de contato, dermatite atópica, vitiligo, psoríase, e até mesmo o câncer de pele, dentre outras (NAKAI; TSURUTA, 2021).

Por outro lado, os compostos antioxidantes são capazes de minimizar e prevenir os danos e o processo de envelhecimento causados à pele pelo estresse oxidativo, isso porque os antioxidantes têm a habilidade reduzir e/ou sequestrar as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (CHEN et al., 2021).

Portanto, as defesas antioxidantes são essenciais para a proteção dos componentes celulares e estabilização dos radicais livres (BAYR, 2005). Os antioxidantes podem ser endógenos, isto é, têm como origem o próprio metabolismo celular, destacando-se enzimas como a superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase (LIGUORI et al., 2018). Por outro lado, os antioxidantes ainda podem ter origem exógena, também chamados de não-enzimáticos, estes dependem de uma ingestão regular de vitaminas como A, C e E, além de compostos fenólicos que apresentam alta atividade antioxidante (LIGUORI et al., 2018).

Assim, os compostos fenólicos desempenham um papel relevante no estresse oxidativo e podem atuar de maneira preventiva e/ou no tratamento de importantes doenças, visto que as EROs estão envolvidas em diversas patogêneses ao favorecer o surgimento e o processo inflamatório (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Especialmente no café, o extrato hidrofílico de grãos da espécie *C. canephora* foi eficiente em eliminar diversas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, uma vez que apresentou altos teores de ácidos clorogênicos (RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015). Não obstante, no trabalho de Babova, Occhipinti e Maffei (2016) quatro extratos de grão verde de diferentes genótipos de *C. canephora* apresentaram as maiores atividades antioxidantes quando comparados aos extratos de *C. arabica*. Além disso, no estudo de Pinheiro et al. (2021), que teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante de flores de *C. canephora* e *C. arabica*, novamente a espécie *C. canephora* se

destacou uma vez que o extrato de flores liofilizadas de café conilon apresentaram maior teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Por fim, recentemente, o estudo de Guidoni (2022) demonstrou a atividade antioxidante em extratos aquosos de células-tronco de *C. canephora*.

1.6. Processo inflamatório

A inflamação é uma reação protetora iniciada após a presença de patógenos ou lesão tecidual (HEADLAND; NORLING, 2015). As respostas inflamatórias, sejam elas locais ou sistêmicas, tem por objetivo eliminar o estímulo iniciante, promover reparação tecidual, e em casos de infecção estabelecer uma memória imunológica (FULLERTON; GILROY, 2016). A resposta inflamatória tem início através de um complexo mecanismo que envolve macrófagos teciduais, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos ativando um programa de citocinas pró-inflamatórias para amplificar a resposta imune (FULLERTON; GILROY, 2016; HEADLAND; NORLING, 2015).

O estresse oxidativo e o processo inflamatório estão intrinsecamente relacionados, visto que a produção de EROs pode modular vários fatores de transcrição induzidos por estresse responsáveis por regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, diferenciação celular e apoptose (BIRBEN et al., 2012; BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além disso, o próprio processo inflamatório produz mediadores que agem recrutando não só células inflamatórias para o local de dano, como também produção de mais espécies reativas (REUTER et al., 2010). Não obstante, o quadro inflamatório pode evoluir para um estágio de inflamação crônica que muitas vezes está associado a doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer e câncer (HAQUE; WOOLERY-LLOYD, 2021). A inflamação crônica de baixo grau, também conhecida como *inflammaging*, está atrelada ao processo de envelhecimento e ao aumento de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- α , estas, por sua vez, estão associadas não só ao surgimento de doenças inflamatórias, mas também contribuem para o envelhecimento inflamatório na pele provocando alterações no tecido, como diminuição da resistência e elasticidade da pele (GOKCEN, 2022).

Conforme apontado por Zhang e Tsao (2016), os compostos fenólicos desempenham um papel importante no quadro inflamatório uma vez que ao

atuarem como antioxidantes, são capazes de interferirem na sinalização do estresse oxidativo e suprimirem as transduções de sinalização pró-inflamatória, atuando de maneira antagônica a ativação de vias de sinalização celular, atribuindo a estes compostos a capacidade de reduzir a inflamação. O efeito anti-inflamatório do café pode ser observado no estudo de Jung et al. (2017), onde extratos aquosos de grãos de café diminuíram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios. Além disso, no estudo realizado por Guidoni (2022), o extrato aquoso de células-tronco de *C. canephora* foi capaz de reduzir significativamente a concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Tendo em vista o expressivo potencial antioxidante de *C. canephora* já descrito neste trabalho, os extratos de célula-tronco do café conilon podem ser uma alternativa para minimizar o estresse oxidativo, e por consequência, o processo inflamatório e seus danos à pele.

1.7. Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo é reconhecido por manifestar uma perda progressiva da funcionalidade e do potencial regenerativo da pele, este processo é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos (CSEKES; RAČKOVÁ, 2021). O envelhecimento intrínseco é considerado um processo cronológico, isto é, representa o curso normal e inevitável do envelhecimento determinado geneticamente (KHAVKIN; ELLIS, 2011; ZHANG; DUAN, 2018). Por consequência, a pele se torna flácida, com linhas de expressão, baixa renovação de células epidérmica e na derme um número reduzido de fibroblastos, este cenário pode levar a um lento processo de cicatrização de feridas, por exemplo (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Por outro lado, o envelhecimento extrínseco é causado por fatores externos, dentre eles a poluição, o tabagismo, agentes xenobióticos e a radiação ultravioleta, está é considerada a mais deletéria a saúde da pele, mas todos contribuem para o aumento da produção de EROs no tecido (RINNERTHALER et al., 2015; TRÜEB, 2021). Em contrapartida, há muitos anos os compostos naturais têm sido utilizados como estratégia em formulações tópicas, uma vez que os metabólitos secundários podem proporcionar resultados benéficos no envelhecimento cutâneo ao prevenir ou retardar a senescência celular

(CSEKES; RAČKOVÁ, 2021). Recentemente, o estudo de Guidoni (2022) demonstrou a ação antioxidante, anti-inflamatória e propriedades regenerativas do extrato aquoso de células-tronco de *C. canephora*, sugerindo que esse extrato biotecnológico pode atuar como um agente natural contra danos à pele.

1.8. Hipótese

A hipótese deste trabalho é que extratos de células-tronco vegetais oriundos de suspensões celulares obtidos a partir de folhas de *C. canephora* cultivados no estado do Espírito Santo exibem alta atividade antioxidante, anti-inflamatória e aumento na proliferação e migração de fibroblastos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a composição química e avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e o efeito na proliferação e migração de fibroblastos *in vitro* dos extratos de células-tronco vegetais oriundos de suspensões celulares obtidos a partir de folhas de *C. canephora* cultivados no estado do Espírito Santo.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer técnicas de cultivo *in vitro* de suspensões celulares a partir de folhas para *C. canephora* utilizando diferentes meios de cultivo;
- Determinar a composição química dos extratos de células-tronco vegetais;
- Quantificar os compostos fenólicos, flavonóides e taninos;
- Determinar a concentração de proteínas totais e aminoácidos presentes nos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e os possíveis efeitos na proliferação e migração de fibroblastos dos extratos obtidos;

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada 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. Foram coletados ramos contendo folhas de *C. canephora* (clone 501) variedade conilon.

3.2. Desinfestação do material vegetal

Após a coleta, os ramos contendo as folhas foram imediatamente transportados para o laboratório em sacos plásticos umedecidos, vedados e devidamente acondicionados em embalagem de isopor. Os ramos provenientes do campo foram colocados em solução de fungicida Derosal® em água (200 µL/1000 mL) (v/v) por 24h. Para a assepsia, foram selecionadas folhas bem expandidas, com coloração verde-intensa e sem sinais de lesões, doenças ou ataque de insetos. A assepsia foi realizada por meio da lavagem das folhas em água corrente por 3 vezes durante 5 minutos. Depois, as folhas foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 2 minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2,5% de cloro ativo por 20 minutos. Por fim, as folhas foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar (REZENDE et al., 2012 com modificações).

3.3. Indução de calos

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

ensaio. Após 45 dias, os calos induzidos em ambos os meios de cultura foram utilizados para o estabelecimento das suspensões celulares e início do banco de germoplasma.

3.4. Cultura de células-tronco vegetais em suspensões celulares

Em câmara de fluxo laminar, os calos friáveis com 45 dias obtidos a partir das folhas foram subcultivados em dois meios de cultura, simples e composto como descrito anteriormente, porém sem a adição do agente gelificante Phytigel® (VENIAL et al., 2020 com adaptações). Os dois meios de cultura das suspensões celulares foram ajustados para um pH de 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos à 1,5 atm. Cada frasco de suspensão continha 60 mL de meio de cultura e recebeu aproximadamente 500 mg de massa celular provenientes dos calos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C no escuro em agitador orbital a 100 rpm por 20 dias. Após este tempo, as suspensões celulares foram subcultivadas por duas vezes a cada 20 dias para proliferação e crescimento das células-tronco vegetais que foram utilizadas em todos os experimentos. Em cada subcultivo, foram utilizados 30 mL do meio de cultura antigo contendo as células-tronco vegetais que foram transferidos para novos frascos contendo 30 mL de meio de cultura novo, totalizando novamente 60 mL. Ao final dos subcultivos, foram obtidos um total de 7 frascos contendo as células-tronco vegetais mais o meio de cultura.

3.5. Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos aquosos foram preparados de acordo com metodologia descrita por Nigra et al. (2021) com modificações. As suspensões celulares (meio de cultura contendo as células) foram triturados uma vez por 5 minutos em liquidificador. Para desintegração completa e extração dos compostos hidrossolúveis, ambos os materiais vegetais foram colocados em ultrassom por 16 minutos e centrifugados a 6000g por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado, congelado a -80 °C e liofilizado. Após a liofilização, os extratos foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados a -20 °C até a realização dos experimentos.

3.6. Quantificação de proteínas

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

3.7. Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia de troca iônica (Hitachi 8800 Amino Acid Analyzer, Tóquio, Japão) com reação de ninidrina pós-coluna de acordo com Liao et al. (2017). A massa das amostras foi registrada e transferida para tubos de hidrólise de vidro, seco por meio de concentração a vácuo de velocidade (Labconco Centrivap Concentrator, Kansas City, MO) e depois hidrolisado usando HCl 6N e fenol a 1% a 110°C durante 24 h em vácuo. Uma solução padrão de aminoácidos para hidrolisado de proteína (Sigma, A9906) à base de Li foi usada para determinar os fatores de resposta e calibrar o analisador Hitachi 8800. 50 µL de injeção de amostra foram carregados na coluna de troca iônica. O tampão de diluição de norleucina foi usado como padrão interno para permitir a correção dos resultados para variações no volume da amostra e variáveis cromatográficas. O valor de absorbância foi medido e o fator de resposta determinado para cada aminoácido individual para quantificar os níveis relativos aos padrões de aminoácidos conhecidos.

3.8. Determinação da composição química por espectrômetro de massa

Os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa LCQ Fleet Ion Trap ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EUA) com introdução de amostra, por infusão direta realizada por uma bomba acoplada a uma seringa e uma fonte APCI operando em modos positivo (+) ou negativo (-) de íons. O espectrômetro foi operado usando os seguintes parâmetros: tensão capilar, 39 (+) / -32 V (-); temperatura capilar, 150°C; temperatura do vaporizador, 350 °C; fluxo de gás de revestimento 20 (arb); fluxo de gás auxiliar 10 (arb); tensão da fonte 6 kV (+) e (-); corrente da fonte: 5 µA (+) /10 µA (-) e energia de colisão, 35 eV. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL usando acetonitrila:água ultrapura (1:1, v/v) como solvente. A acetonitrila, grau

cromatográfico, foi adquirido da Tedia (Fairfield, OH, EUA). A água foi purificada usando um sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA). O sinal foi adquirido na faixa m/z de 100 a 1000. Os resultados foram comparados com a literatura para tentativa de identificação dos compostos.

3.9. Quantificação de polifenóis totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ESQUIVEL-ALVARADO et al., 2020) com modificações. Para o ensaio, foram utilizados 200 µL de água ultrapura, 15 µL de reagente Folin-Ciocalteu, 30 µL de amostra e 50 µL de carbonato 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 grama de amostra (mg de EAC/100 g de amostra).

3.10. Quantificação de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi realizado por método espectrofotométrico utilizando cloreto de alumínio conforme proposto por Xu e Chang (2007) com modificações. Em microplaca foram adicionados 180 µL de amostra e 15 µL de NaNO₂ 2,5 %. Após seis minutos foram adicionados 15 µL de AlCl₃ 10% e, depois de cinco minutos, foram adicionados 50 µL de NaOH 1M. Aguardou-se 10 minutos à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina. As leituras foram realizadas a 415 nm e os resultados expressos em microgramas equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg eq quercetina/g amostra).

3.11. Ensaio químicos de atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos colorimétricos do sequestro do radical livre ABTS a 734 nm (RE et al., 1999), sequestro do radical livre DPPH a 517 nm (BLOIS, 1958), a capacidade redutora do íon Fe³⁺ para o íon Fe²⁺ pelo método FRAP a 595 nm (BENZIE; STRAIN, 1996) e pelo método do sequestro do radical superóxido (SUZUMURA; YASUHARA; NARITA, 1999) a 560 nm. A atividade antioxidante dos extratos será comparada com a ação do ácido cafeico. Os resultados serão expressos

como um valor de IC₅₀ (µg/mL) obtido de três experimentos independentes (n = 3) em triplicata.

3.12. Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

Para investigar a atividade citotóxica foi utilizado o método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). Neste estudo, foram empregadas culturas de células fibroblastos (L929) e macrófagos RAW 264.7. As culturas foram incubadas com diferentes concentrações (1-1000 µg/mL) dos extratos por 24h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, a cultura foi incubada com o MTT por 2h e em seguida adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos com agitação para dissolução dos cristais de formazana. A leitura da absorbância das placas foi realizada em leitor de ELISA (Elisa Spectracount Packad – EUA), utilizando-se filtros de 595 nm.

3.13. Efeito preventivo contra danos oxidativos em L929 causados por H₂O₂

O efeito protetor das amostras contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em fibroblastos foi realizado de acordo com metodologia descrita por Lorençoni et al. (2021). Fibroblastos L929 foram plaqueados em placas de 96 poços a uma densidade de 1,2 × 10⁴ células/poço. Após 24 horas as células foram expostas a diferentes concentrações de amostra (0,1, 10 e 1000 µg/mL) e após 30 min, foi adicionado H₂O₂ 250 µM. Catalase (10 UI/mL) foi usada como controle positivo. Após 2 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e os resultados foram expressos como média ± DP de viabilidade celular (%).

3.14. Determinação de óxido nítrico *in vitro*

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi realizada pela determinação da influência do estresse oxidativo sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos. Macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir a 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (0,1, 10 e 1000 µg/mL) dos extratos por 60 minutos antes ou depois da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 µg/mL). Decorridas 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 naftiletenodiamina em água; 1:1) e a concentração de nitrito foi calculada por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio (GREEN et al., 1982). A leitura da absorbância das placas para a quantificação de nitrito foi feita em leitor de ELISA a 540 nm.

3.15. Redução da produção do ânion superóxido

O potencial efeito inibitório dos extratos sobre a produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS foi avaliado pelo ensaio do superóxido (CHOI; KLESSIG, 2016; PINHO et al., 2011; STURROCK et al., 2006). 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 removido e foi adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) e incubadas por 2h. Após, as células foram lavadas com metanol e secas e então os cristais de formazana formados foram dissolvidos e a densidade óptica mensurada a 630 nm, usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção de ânion superóxido.

3.16. Determinação de citocinas *in vitro*

Macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir de 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (0,1, 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos por 60 minutos antes da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$). Decorridas 24h, o sobrenadante celular foi utilizado para quantificação da citocina fator de necrose tumoral α (TNF- α) empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). Para tal, a citocina foi detectada através de anticorpos de captura, e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com instruções do fabricante (eBioscience[®]). Como substrato, foi utilizado o-Phenylenediamine (OPD) ou

tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro contendo filtro de 420 nm. A concentração de citocina foi determinada pela equação da reta comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para a citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras.

3.17. Estudo do efeito dos extratos sobre a proliferação celular

O efeito sobre a proliferação de fibroblastos foi determinado utilizando Kit de quantificação da proliferação celular – BrDU seguindo as especificações do fabricante (Roche® Mannheim, Alemanha). As células de fibroblastos foram mantidas em cultura com meio Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C, 5% de CO₂. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3000 células/poço, com 150 µL de meio sem FBS. Após 24 horas, diferentes concentrações dos extratos foram adicionadas ao meio junto com BrDU (com uma diluição de BrDU de 1:1000 a uma diluição final de 1:4000). Então, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. O ensaio de proliferação celular foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (catalogo nº 11647229001; Roche Applied Sciences).

3.18. Efeito dos extratos na migração de fibroblastos

A análise da proliferação e migração de fibroblastos foi realizada utilizando o *scratch assay* como modelo experimental de acordo com Fronza et al. (2008). As células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem uma monocamada confluenta. Uma ferida artificial (*scratch*) linear foi induzida na monocamada. As placas foram lavadas com solução salina estéril (PBS) com a finalidade de remover as células durante a realização da ferida. Em seguida, os poços contendo células foram divididos em grupos e tratados ou não por um período de 14 horas com diferentes concentrações das amostras em estudo. PDGF foi utilizado como controle positivo. Após o tratamento, as células foram fixadas e coradas com DAPI. Imagens das áreas raspadas foram feitas usando câmera fotográfica acoplada ao microscópio. A migração das células para o interior da região raspada (do *scratch*) foi quantificada usando CellC software®.

3.19. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EUA 176). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA – one-way) seguido por pós-teste de Tukey e/ou teste t, no qual valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos extratos vegetais

O processo de extração aquosa das suspensões celulares de *C. canephora* resultou em dois extratos secos, chamados de extrato suspensão meio simples (ESMS), em menção as células-tronco cultivadas em meio de cultura simples, e extrato suspensão meio composto (ESMC), em menção as células-tronco cultivadas em meio de cultura composto.

Sendo assim, a cultura de suspensões celulares forneceu, após o processo de extração e liofilização, um rendimento de 4,7 g de massa seca para o ESMS, enquanto o ESMC teve um rendimento de 6,5 g.

4.2. Quantificação de proteínas

A tabela 1 mostra a concentração de proteínas totais em ambos os meios de cultura. O ESMS apresentou uma quantidade maior de proteínas ($809,61 \pm 8,67 \mu\text{g/mL}$) comparativamente ao ESMC ($619,49 \pm 3,06 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de proteínas totais extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora*.

Amostras	Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
ESMS	$809,61 \pm 8,67^a$
ESMC	$619,49 \pm 3,06^b$

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

4.3. Análise de aminoácidos

Pela primeira vez, o perfil de aminoácidos de extratos de células-tronco vegetais a partir de suspensões celulares de *C. canephora* foi realizado. A tabela 2 mostra os aminoácidos identificados em ambos os meios de cultura. Foram identificados em ambos os meios 15 aminoácidos, sendo a asparagina e a glicina os aminoácidos identificados em maior quantidade no ESMS, enquanto no ESMC os aminoácidos identificados em maior quantidade foram a prolina e a glutamina.

Tabela 2. Quantificação de aminoácidos dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora*.

Aminoácidos	ESMS*	ESMC*
Glicina	10,54	6,01
Lisina	5,45	5,15
Histidina	4,40	2,52
Arginina	2,97	2,04
Asparagina	13,89	6,48
Glutamina	7,46	9,52
Serina	7,20	4,13
Treonina	4,60	2,66
Tirosina	1,72	1,32
Alanina	7,96	4,48
Valina	5,85	3,24
Leucina	3,90	2,90
Isoleucina	3,12	3,72
Prolina	5,90	15,69
Fenilalanina	2,65	1,40

* resultados são expressos em resíduos de cada aminoácido específico a cada 100 resíduos de aminoácidos totais.

4.4. Determinação da composição química por espectrômetro de massa

Os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* foram analisados nos modos de ionização APCI negativo (Figura 1) e positivo (Figura 2) com monitoramento da faixa de massa m/z de 100 a 1000. O processamento e comparação dos espectros obtidos por MS-MS dos extratos com a literatura levaram à identificação preliminar de cinco compostos (Tabela 3), usando o modo de ionização negativa, sugerindo um flavonoide, dois açúcares, uma cumarina e uma antraquinona.

O flavonoide identificado foi 3,7-Dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona que apresentou m/z 315 $(M+H)^+$ para a molécula protonada e fragmento do íon m/z 300, indicando, também, perda do grupo metil (15D).

A cumarina, esculina, foi caracterizada pela molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 341. Os íons fragmentos em m/z 179 e 151 obtidos do espectro MS/MS indicando a perda de hexose (162 Da) e mais CO (28 Da) do íon precursor $[M+H]^+$ (WANG et al., 2016).

A antraquinona emodina identificada apresenta um aduto de amônio como íon precursor em m/z 388. Os íons fragmentados da molécula protonada foram $[M+H]^+$ m/z 271 e m/z 227, relacionados à eliminação de CO e posteriormente pela perda de uma hidroxila (LIU et al., 2020).

Além disso, também foi identificado o dissacarídeo sacarose. A sacarose apresenta dois adutos, molécula desprotonada, m/z 341 $(M-H)^-$, e aduto de formato $[M+CH-O_2]^-$, m/z 387. A molécula desprotonada apresentou como fragmento principal em m/z 179 gerado a partir quebra da ligação glicosídica.

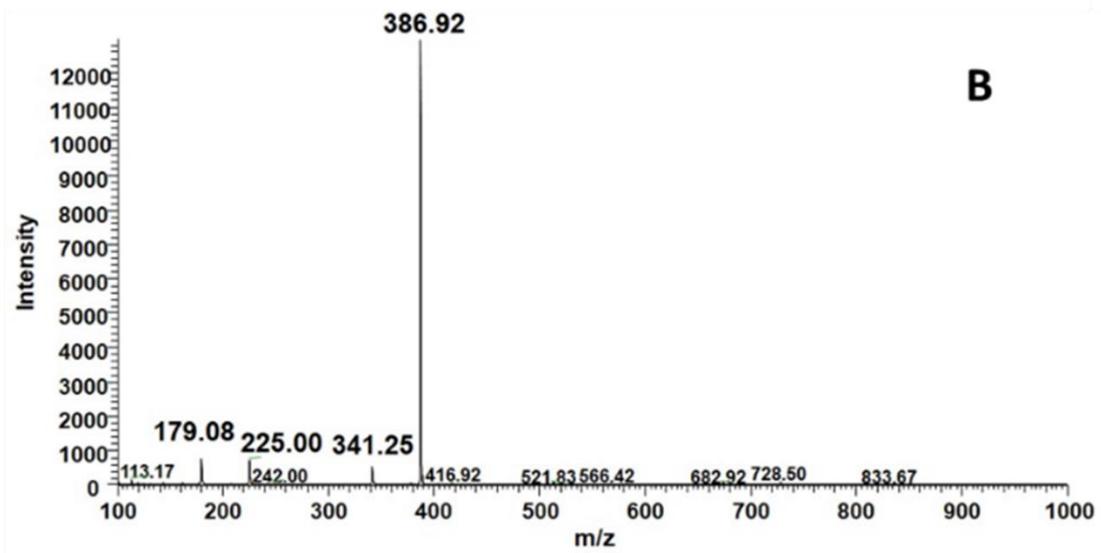
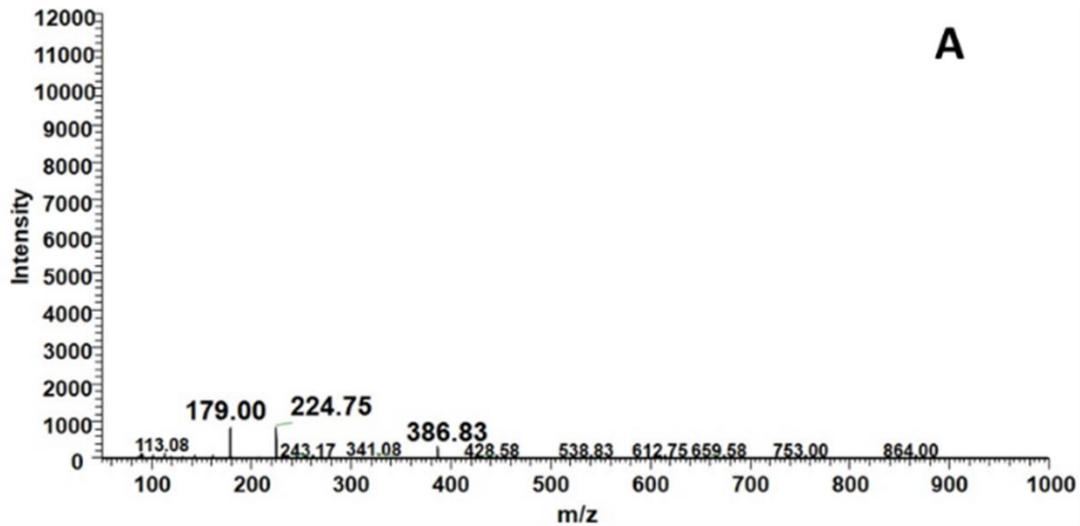


Figura 1. APCI-MS negativo representativo para os extratos de suspensão meio simples (ESMS) (**A**) e suspensão meio composto (ESMC) (**B**) de *C. canephora*.

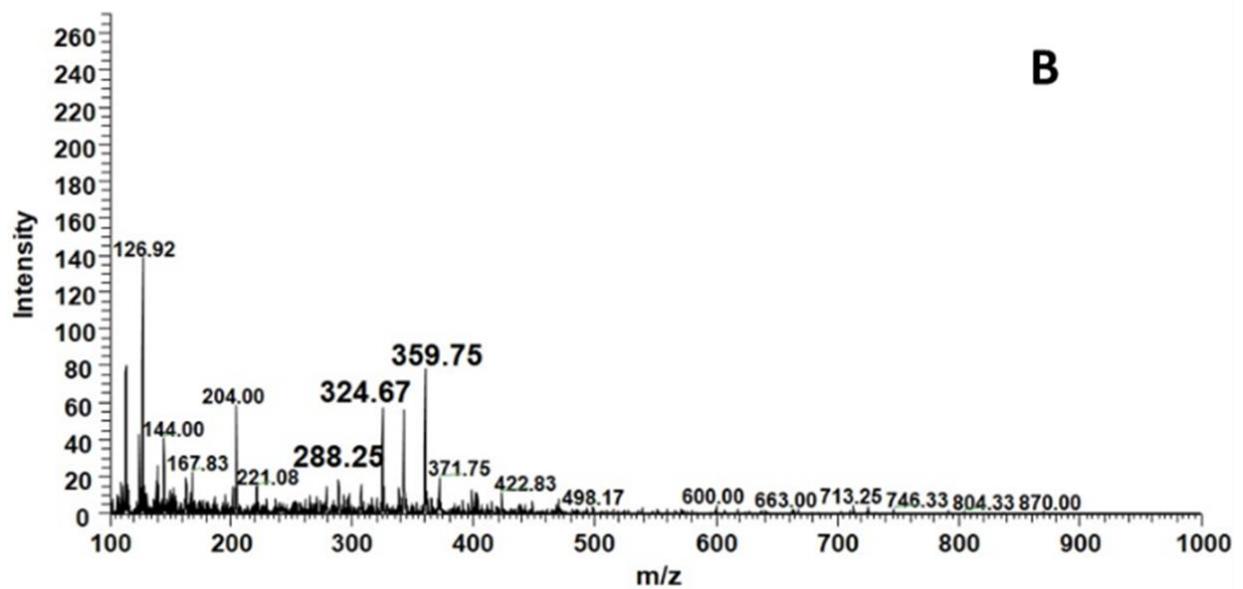
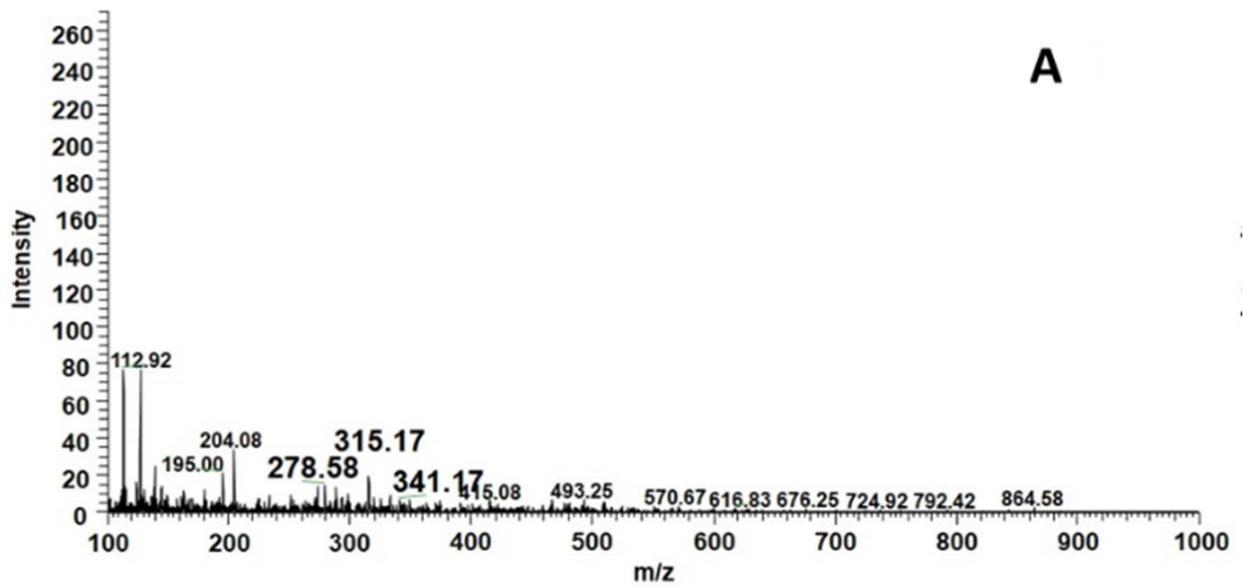


Figura 2. APCI-MS positivo representativo para os extratos de suspensão meio simples (ESMS) **(A)** e suspensão meio composto (ESMC) **(B)** de *C. canephora*.

Tabela 3. Compostos preliminares identificados nos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora*.

Composto	Aduto	Íon precursor	Fragmento de íon	Amostra	Referência
Emodina	[M+NH ₄] ⁺	288	271, 227	ESMC	LIU et al., 2020
Hexose	[M-H] ⁻	179	161, 143, 89	ESMS, ESMC	SILVA et al., 2022
3,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone	[M+H] ⁺	315	300, 299, 271	ESMS	HORAI et al., 2010
Esculina	[M+H] ⁺	341	179, 151	ESMS	WANG et al., 2016
Sucrose	[M-H] ⁻	341	179	ESMC	SILVA et al., 2022
Sucrose	[M+CH-O ₂] ⁻	387	341	ESMS, ESMC	VALGIMIGLI et al., 2012

[M - H]⁻: molécula desprotonada. [M + H]⁺: molécula protonada. [M+NH₄]⁺: aduto de amônio. [M+CHO₂]⁻: aduto de formato. ESMS: extrato suspensão meio simples; ESMC: extrato suspensão meio composto.

4.5. Quantificação de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante

A análise quantitativa dos teores de polifenóis totais, de flavonoides e da atividade antioxidante nos extratos de suspensões celulares de *C. canephora* estão na Tabela 4. O maior conteúdo de fenólicos totais foi encontrado no ESMC (78,24 ± 0,03 mg de EAC/100 g de amostra), por outro lado, no ESMS foi encontrado o maior teor de flavonoides (0,13 ± 0,01 mg de quercetina/g de amostra).

Os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* exibiram expressiva habilidade em reduzir íon Fe³⁺ para o íon Fe²⁺ pelo método FRAP com valores de IC₅₀ próximos aos valores obtidos com o ácido cafeico (Tabela 3). Contudo, foi necessária uma concentração menor de ESMS para inibir 50% dos radicais livres (3,96 ± 0,19 µg/mL) comparativamente ao ESMC (7,35 ± 0,21 µg/mL). Por outro lado, o ESMC demonstrou uma capacidade sequestrante superior do radical O₂ (72,94% ± 1,44) quando comparado ao ESMS (34,79% ± 3,60).

Por fim, os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* não exibiram capacidade sequestrante para os radicais ABTS e DPPH (Tabela 4) até a concentração de 20 mg/mL.

Tabela 4. Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora*.

	ESMS	ESMC	Ácido Cafeico
Fenólicos totais*	64,82 ± 0,03 ^b	78,24 ± 0,03 ^a	-
Flavonoides*	0,13 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	-
FRAP [#]	3,96 ± 0,19 ^b	7,35 ± 0,21 ^a	2,02 ± 0,01 ^c
ABTS [#]	>20000	>20000	0,38 ± 0,01
DPPH [#]	>20000	>20000	4,48 ± 0,03
O ₂ (I%-20 mg/mL)**	34,79 ± 3,60 ^c	72,94 ± 1,44 ^a	63,28 ± 1,05 ^b

Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas (p<0,05).

Resultados expressos como:

*Fenolicos totais: mg equivalentes de ácido clorogênico/100 g de amostra

*Flavonoides: mg equivalentes de quercetina/g de amostra

[#]FRAP, ABTS e DPPH: IR₅₀ – concentração da amostra em µg/mL capaz de inibir 50% dos radicais livres

**O₂ I% - porcentagem de inibição da amostra em uma concentração de 20 mg/mL e ácido cafeico em uma concentração de 500 µg/mL.

4.6. Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

Não foram observados efeitos citotóxicos dos extratos linhagens celulares RAW 264.7 (macrófago) e L929 (fibroblasto) usando o método colorimétrico MTT em concentrações de até 1000 µg/mL.

4.7. Efeito preventivo contra danos oxidativos em L929 causados por H₂O₂

Os efeitos preventivos dos extratos de suspensões celulares de *C. canephora* contra os danos celulares induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram avaliados em fibroblastos L929. Conforme observado na Fig. 3, os extratos ESMS e ESMC não apresentaram ação protetora contra danos oxidativos em qualquer uma das concentrações (1-1000 µg/mL) testadas usando este método.

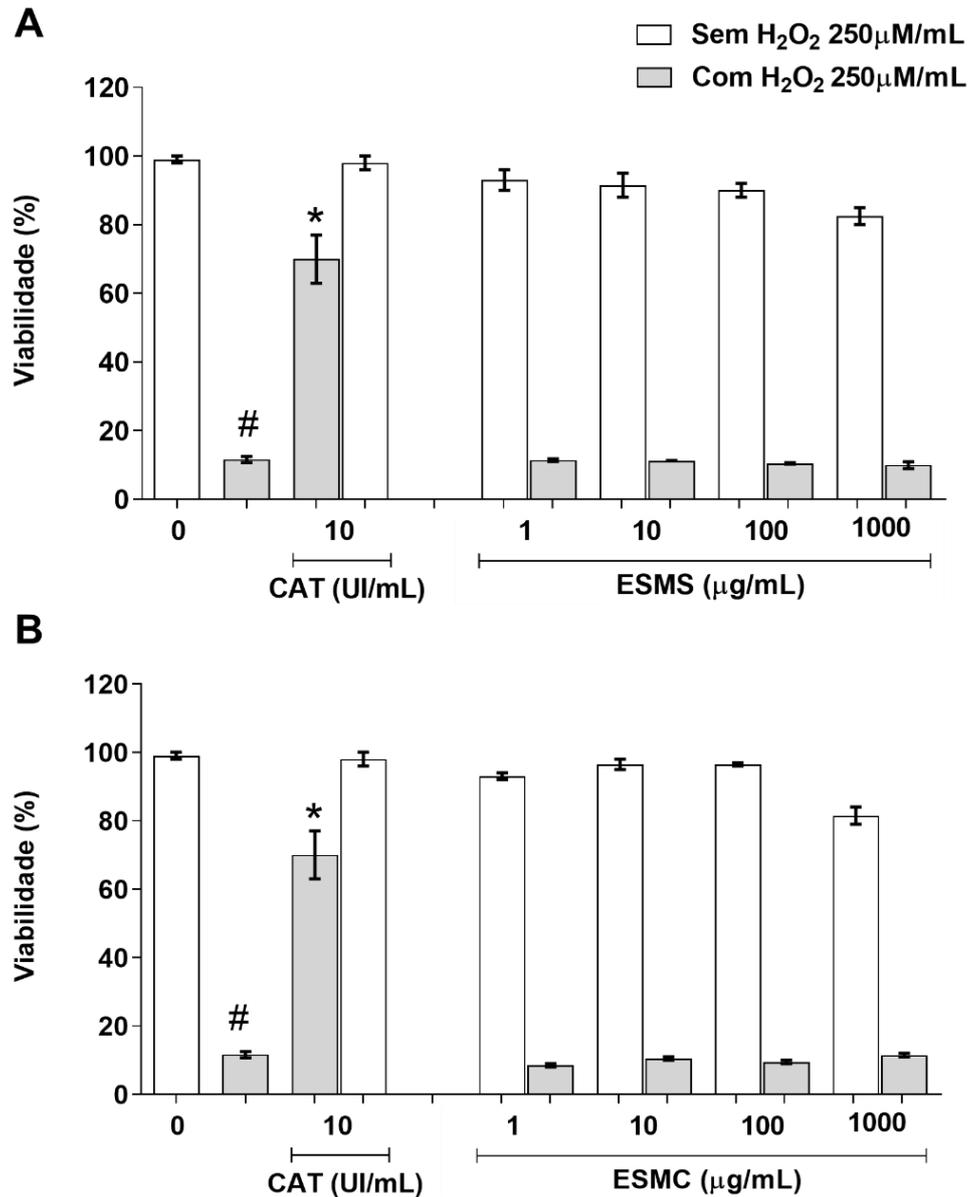


Figura 3. Efeito protetor dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) **(A)** e suspensão meio composto (ESMC) **(B)** de *C. canephora* avaliado em fibroblastos L929 contra danos causados por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações de amostra na presença ou ausência de H₂O₂. Catalase a 10 UI/mL (CAT) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) em relação ao controle negativo sem H₂O₂. *Significativo (p < 0,05) em relação ao controle de H₂O₂ por ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Tukey.

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

Os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* foram capazes de inibir a produção de NO (Fig. 4). Inibições de 35,78 e 31,83% na produção de NO foram observadas após exposição a ESMS e ESMC na concentração de 10 µg/mL, respectivamente (Fig. 4). Para controle positivo, L-NIL um inibidor específico da i-NOS (30 µM), foi observado uma inibição de 43,40% quando comparada ao grupo controle LPS.

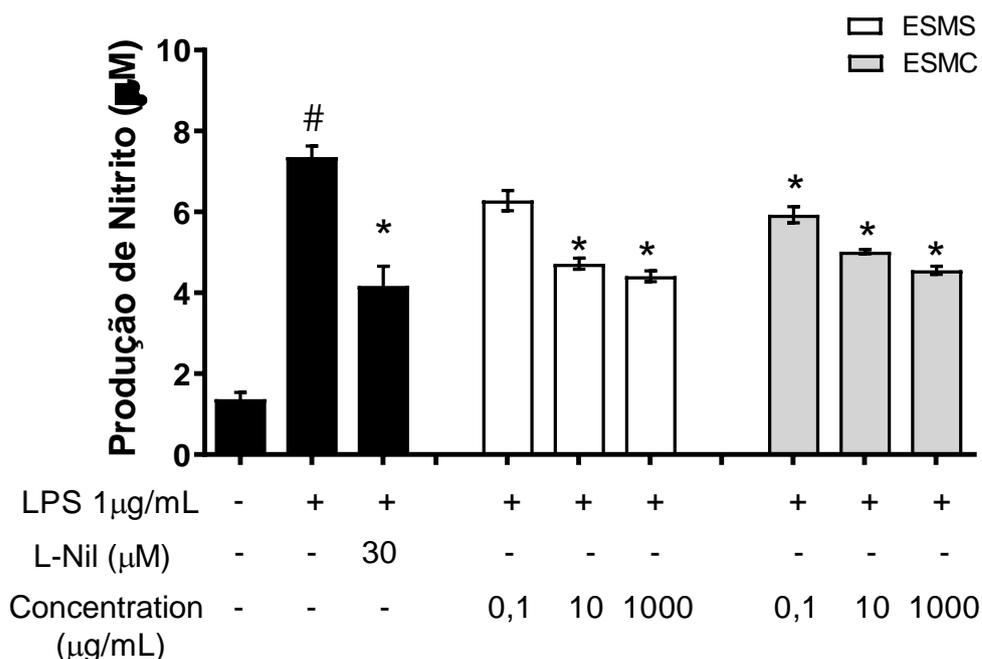


Figura 4. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na produção óxido nítrico (NO). Macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostra e estimulado com LPS (1 µg/mL). L-NIL a 30 µM foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média ± DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) comparado ao controle negativo sem LPS. *Significativo (p < 0,05) comparado ao controle com células induzidas por LPS por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

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

Os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* também apresentaram efeito inibitório na produção do radical superóxido de forma dose dependente em cultura de macrófagos estimulados com LPS (Fig.5). Na concentração de 1000 µg/mL foi inibido 87,06% da produção para ESMS, enquanto para ESMC foi inibido 63,69% quando comparado ao grupo controle

LPS. O tempol (10 μM) foi utilizado como controle positivo e alcançou o efeito inibitório de 76,52% em comparação ao grupo controle LPS (Fig.5).

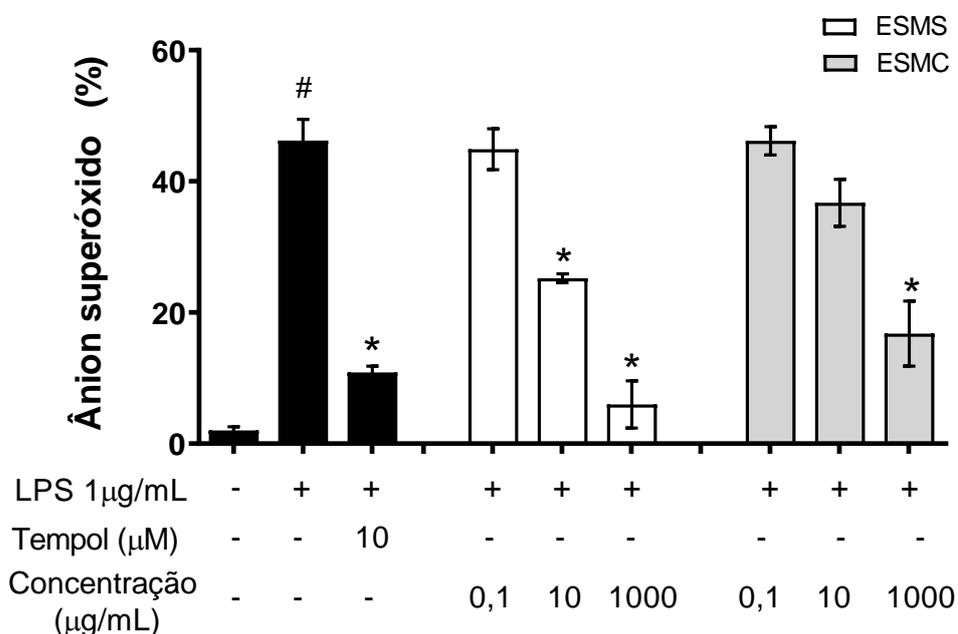


Figura 5. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na produção do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostra e estimulado com LPS após 30 min. Tempol 10 μM (TPL) foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm DP ($n = 3$). #Significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo sem LPS. * Significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle com células induzidas por LPS por via unidirecional ANOVA seguida de teste post hoc de Tukey.

4.10. Redução da produção de citocinas *in vitro*

Conforme observado na figura 6, a exposição dos macrófagos ao LPS produziu um aumento significativo na produção da citocina inflamatória TNF- α . Quando as células foram expostas ao LPS em conjunto com os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ observou-se um efeito inibitório significativo, de 31,99% para ESMS e 37,12% para ESMC, na produção de TNF- α (Fig.6).

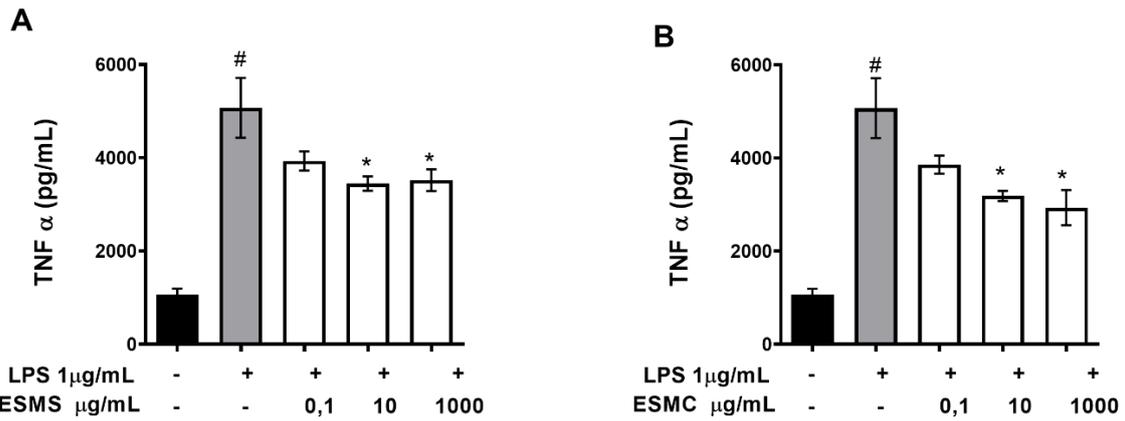


Figura 6. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora* sobre a concentração da citocina pró-inflamatória TNF- α . Macrófagos RAW 264.7 foram expostos a diferentes concentrações de amostras na presença ou ausência de LPS. Os resultados foram expressos como média \pm DP (n = 3). #Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle negativo sem LPS. * Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle com células induzidas por LPS por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.11. Proliferação de fibroblastos *in vitro*

As células tratadas com os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* também mostraram 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 (Fig. 7).

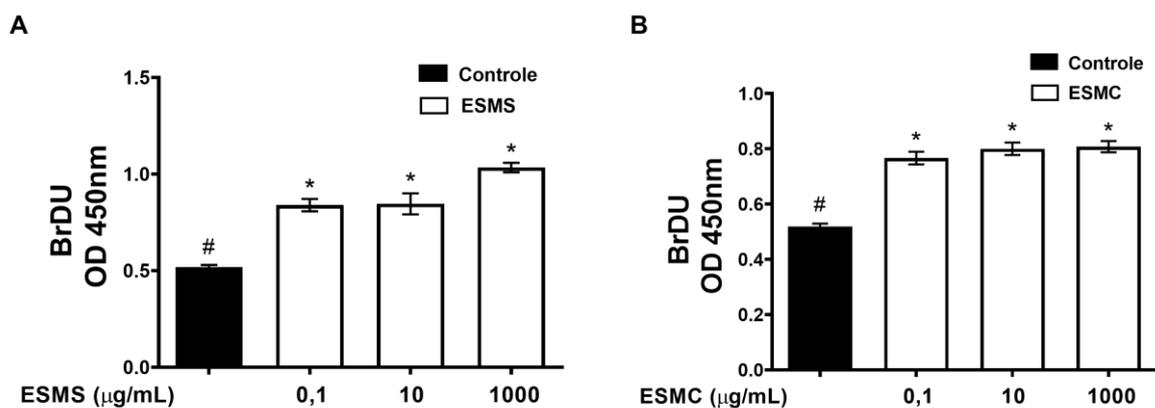


Figura 7. Efeito dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) (A) e suspensão meio composto (ESMC) (B) de *C. canephora* na proliferação de fibroblastos. Os resultados foram expressos como a absorvância no comprimento de onda de 450 nm e são

expressos como a média \pm DP (n = 3). #Controle negativo *Significativo (p < 0,05) em comparação com o controle por ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey.

4.12. Efeito dos extratos na migração celular *in vitro*

Os resultados demonstraram que o ESMS e o ESMC, em diferentes concentrações, promoveram a migração/proliferação de fibroblastos de forma dose dependente de 0,1, 10 e 1000 μ g/mL, respectivamente (Figs. 8A e 8B). Além disso, especificamente o ESMC se destacou a 1000 μ g/mL, com resultado superior ao controle positivo de PDGF (Figs. 7A e 7B).

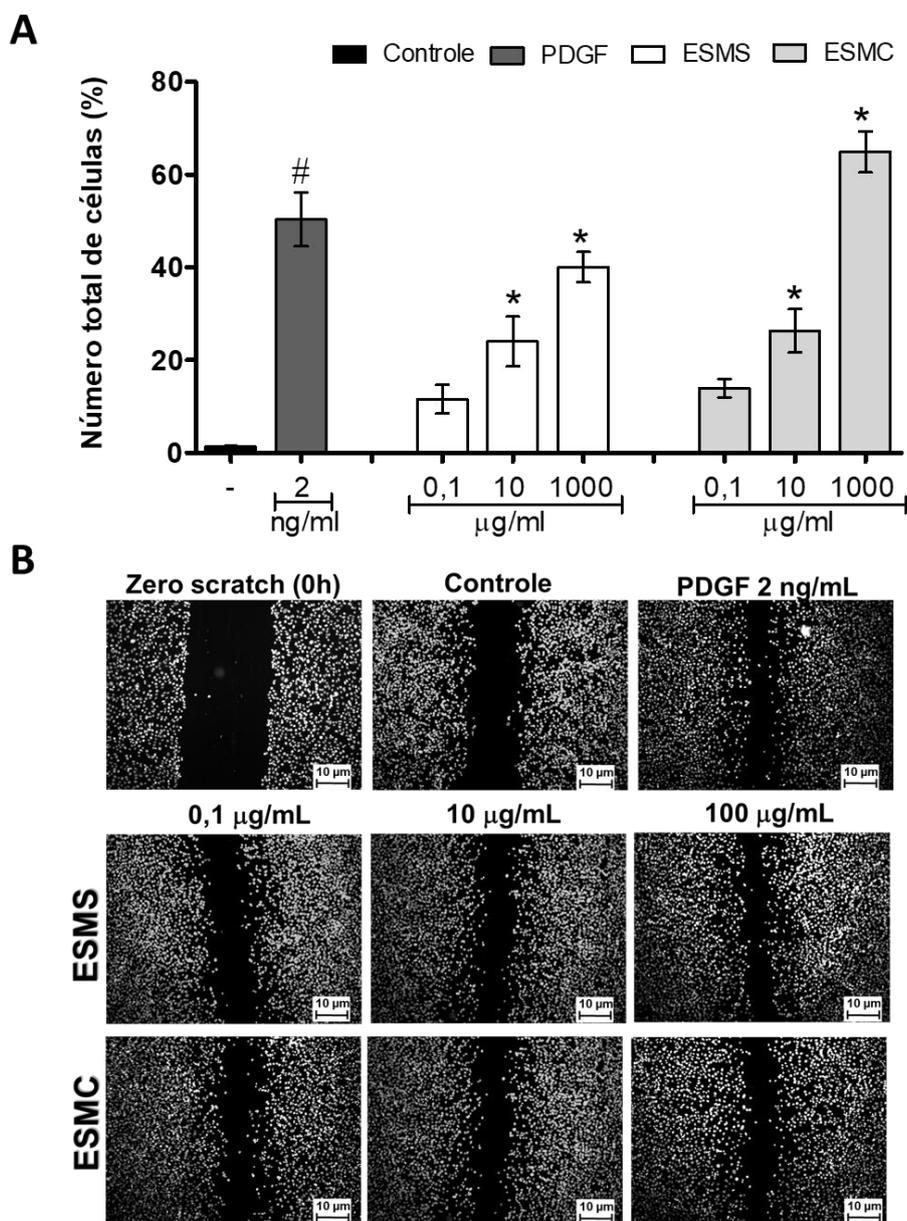


Figura 8. Influência dos extratos de suspensão meio simples (ESMS) e suspensão meio composto (ESMC) de *C. canephora* na proliferação e/ou migração de L929 fibroblastos no ensaio de raspagem. **A)** porcentagem do número total de células presentes na ferida artificial após 14 h de incubação (37 °C a 5% CO₂) sem (controle) ou com ESMS e ESMC nas concentrações de 0,1, 10 e 1000 µg/mL e PDGF 2 ng/mL (controle positivo). **B)** Imagem representativa ilustrando a ferida criada na monocamada de fibroblastos imediatamente após a lesão (zero Scratch 0 h) e após 14 h, conforme indicado em cada painel. As barras representam a média ± SD de três independentes experimentos. (p < 0,05) indica diferenças significativas em comparação com células não tratadas (controle); # (p < 0,05), em comparação com PDGF.

5. DISCUSSÃO

Os extratos obtidos a partir da cultura de células-tronco vegetais são uma importante fonte de metabólitos, primários e secundários, com propriedades biológicas, uma vez que a produção *in vitro* é padronizada, livre de contaminantes, bio-sustentável e permite a produção em escala industrial (BARBULOVA; APONE; COLUCCI, 2014). Há muitos anos os extratos vegetais são estudados por serem reconhecidos por suas propriedades biológicas que permitem aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (RAHMAN et al., 2021). Aliado ao potencial biotecnológico, estes extratos obtidos de células-tronco vegetais podem ser incorporados em formulações tópicas, uma vez que a riqueza em metabólitos, como polifenóis, flavonóides, açúcares, aminoácidos e proteínas, apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e regenerativas (MIASKOWSKA; SIKORA, 2018). Estudos já relataram a atividade antioxidante (LEMOS et al., 2022; PINHEIRO et al., 2021; RODRIGUES; SALVA; BRAGAGNOLO, 2015), anti-inflamatória (LEMOS et al., 2022) e fotoprotetora (WAGEMAKER et al., 2011) de extratos *ex vitro* de *Coffea* sp. Contudo, ainda são escassos os estudos a respeito da atividade biológica em extratos de suspensões celulares de *C. canephora*.

Os extratos vegetais são uma matéria prima complexa, rica em metabólitos primários e secundários. Ao se tratar de metabólitos primários, o teor de proteínas e o perfil de aminoácidos foi realizado pela primeira vez em extratos de suspensões celulares de *C. canephora*. Os aminoácidos são nutrientes importantes para promover a cicatrização de feridas e reparar a pele danificada,

protegendo-a contra danos causados pela luz solar (SOLANO, 2020). Os metabólitos primários, incluindo proteínas e aminoácidos, são considerados compostos importantes para o desenvolvimento de formulações tópicas, uma vez que agregam diferentes atividades terapêuticas aos extratos (MIASKOWSKA; SIKORA, 2018). Entre os aminoácidos observados nos extratos destaca-se a glicina. A glicina tem ação direta na síntese de proteínas da pele participando ativa e diretamente na produção de colágeno e elastina, representando aproximadamente 1/3 dos aminoácidos presentes no colágeno, e apresentando também ação antioxidante e anti-inflamatória (LI; WU, 2018). Outro aminoácido majoritário presente nos extratos foi a prolina. Este aminoácido participa da síntese de proteínas da pele produzida pelos fibroblastos, incluindo o colágeno e a elastina, além disso, é essencial para a produção, estrutura e força do colágeno, contribui também para a sinalização de fatores de crescimento nas células e para eliminação de radicais livres (ALBAUGH; MUKHERJEE; BARBUL, 2017; LI; WU, 2018). Basicamente, a glicina e a prolina são os dois aminoácidos mais abundantes no colágeno e por consequência desempenham um papel primordial na síntese, estrutura e manutenção dessa proteína (ALBAUGH; MUKHERJEE; BARBUL, 2017).

Para os metabólitos secundários destacamos a presença de um teor relevante de polifenóis totais. O estudo de Wongsu et al. (2019) demonstrou que o teor de fenólicos totais em extratos aquosos de grãos de *C. canephora* torrado foi de 27,2 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de amostra, inferior ao teor de fenólicos totais presentes no ESMS ($64,82 \pm 0,03$ mg EAC/100 g) e no ESMC ($78,24 \pm 0,03$ mg EAC/100 g) que se destaca por apresentar um conteúdo quase três vezes superior ao encontrado por Wongsu et al. (2019). Não obstante, é possível ainda comparar o conteúdo de fenólicos totais das suspensões celulares de *C. canephora* ao que já foi descrito em extratos de células-tronco em outras espécies. Rodríguez-Hernandez et al. (2018) investigaram o teor total de fenólicos em extratos de células-tronco vegetais de *Olea europaea*, onde os polifenóis totais foram 20,8 mg EAG/100 g, demonstrando novamente que os ESMS e ESMC apresentaram um conteúdo relevante de fenólicos.

Por outro lado, a quantidade de flavonoides nos ESMS e ESMC não foi relevante quando comparado ao extrato *ex vitro* de polpas úmidas *C. canephora*. O estudo de Kieu Tran et al. (2020) demonstrou que o teor de flavonoides em

extratos hidrometanólicos da polpa de *C. canephora* variou de 1,48 a 13,17 mg equivalentes de catequina/g de amostra. Contudo, ainda que o conteúdo não tenha sido abundante quando comparado ao extrato de polpa úmida do café, ambos os extratos de suspensões celulares apresentaram maior teor de flavonoides em relação ao extrato de calos da espécie *O. europaea* (0,0006 mg QE/100 g amostra) no estudo de Rodríguez-Hernandez et al. (2018). Assim, os polifenóis e flavonoides são reconhecidos na literatura pelos diversos efeitos benéficos contra uma ampla variedade de patologias, incluindo inflamação, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e envelhecimento cutâneo (LUTZ et al., 2019; RAHMAN et al., 2021), em razão, principalmente, da ação antioxidante que reduz o dano oxidativo, constituindo um boa alternativa na terapia e prevenção de doenças e envelhecimento precoce (CHERUBIM et al., 2020).

Além disso, a presença de emodina, identificada no ESMC pode ser responsável por atribuir propriedades biológicas ao extrato, uma vez que a literatura destaca o potencial antioxidante e anti-envelhecimento desse composto (SEMWAL et al., 2021). Já a esculina, identificada no ESMS, é descrita na literatura por apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (LI et al., 2022; OWCZAREK et al., 2021).

A presença desses metabólitos secundários pode estar relacionada à atividade antioxidante dos extratos de suspensões celulares de *C. canephora*. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os ESMS e ESMC têm a capacidade de atuar como antioxidante ao reduzir íon Fe^{3+} para o íon Fe^{2+} no método FRAP. O estudo de Lemos et al. (2022) investigou a atividade antioxidante do extrato etanólico de grãos verdes de nove genótipos de café conilon com diferentes graus de maturação. Nessas amostras o IC_{50} da capacidade redutora no método FRAP variou de 19,9 a 150 $\mu g/mL$. Desta forma, os ESMS e ESMC apresentaram resultados superiores, exibindo menores valores de IC_{50} $3,96 \pm 0,19 \mu g/mL$ e $7,35 \pm 0,21 \mu g/mL$, respectivamente, demonstrando um alto potencial antioxidante nos extratos de suspensões celulares de *C. canephora*.

A respeito da habilidade em sequestrar espécies reativas de oxigênio, o estudo de Rodrigues, Salva e Bragagnolo (2015), demonstrou que diferentes genótipos de *C. canephora* foram capazes de sequestrar o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e ácido hipocloroso em concentrações que

variaram 1,25 µg/mL a 1022 µg/mL, diferentemente do que foi observado neste estudo, em que foi necessário 20 mg/mL de ESMS e ESMC para inibir 34,79% ± 3,60 e 72,94% ± 1,44, respectivamente, do radical superóxido (O_2^-). Ainda que no presente estudo a concentração dos extratos tenha sido alta para inibir o radical O_2^- , o primeiro estudo a desenvolver uma formulação tópica de extrato de suspensão celular de *C. canephora* demonstrou que foi necessário 10% do material vegetal lipossomado para desenvolver o produto e obter resultados satisfatórios com eficiente atividade antioxidante (GUIDONI, 2022; GUIDONI et al., 2022). Desta forma, levando em consideração que as formas de apresentação das formulações cosméticas possuem quantidade superior a 1 g para o consumidor final, o ESMS e ESMC podem facilmente ser empregados em concentrações iguais ou superiores a 20 mg/mL e desempenhar a atividade sequestrante do radical O_2^- . Por fim, a atividade antioxidante expressiva no método FRAP e O_2^- sugerem que esses extratos tenham uma atividade antioxidante específica para alguns radicais e/ou elétrons.

Na pele, o excesso de EROs é gerado, principalmente, quando há exposição aos raios ultravioleta (NAKAI; TSURUTA, 2021). Quando as EROs e outros agentes oxidantes excedem a capacidade antioxidante do organismo, ocorre o chamado estresse oxidativo (NAKAI; TSURUTA, 2021). Por sua vez, o estresse oxidativo está diretamente ligado a inflamação, em razão das EROs que alteram as estruturas das proteínas, induzem a apoptose celular e influenciam na liberação de citocinas inflamatórias (LUTZ et al., 2019; NAKAI; TSURUTA, 2021).

No processo inflamatório, células são ativadas, dentre elas o macrófago. Essas células produzem mediadores inflamatórios, sendo alguns deles o NO, O_2^- , fatores de transcrição, e citocinas (ARULSELVAN et al., 2016).

O NO e o O_2^- fazem parte do metabolismo celular e devem estar presentes em níveis fisiológicos para manter a homeostase, mas em excesso podem comprometer as funções celulares (MAN et al., 2022). Ambos desempenham um papel importante na inflamação uma vez que contribuem para o dano às células endoteliais e o aumento da permeabilidade microvascular, recrutamento de neutrófilos em locais de inflamação e geração de peroxinitrito que sofre várias reações oxidativas deletérias com moléculas biológicas, como aminoácidos, açúcares e lipídios (RADI, 2018). O desequilíbrio entre NO e O_2^-

nas células é considerado um fator importante no processo de envelhecimento uma vez que é responsável pela disfunção mitocondrial, estimulação da apoptose e outras alterações patológicas do envelhecimento (AFANAS'EV, 2009). Além disso, o NO tem sido considerado um mediador chave no desenvolvimento de inflamação cutânea, estando presente em dermatite atópica, alérgica, psoríase, dentre outros (MAN et al., 2022).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os ESMS e ESMC foram capazes de inibir 35,78 e 31,83% na produção de NO a uma concentração de 10 µg/mL, respectivamente. O estudo de Lemos et al. (2022) demonstrou que apenas 6 de 27 extratos etanólicos de grãos *ex vitro* *C. canephora* foram capazes de inibir a produção de NO a uma concentração de 50 µg/mL. A inibição variou de 13,3% a 26,9%, revelando que os ESMS e ESMC apresentaram, neste estudo, capacidade inibitória de NO superior aos extratos etanólicos de grãos verdes de café conilon testados por Lemos et al. (2022).

Por outro lado, na produção do $O_2^{\cdot-}$, o estudo de Lemos et al. (2022) demonstrou que algumas amostras de *C. canephora* apresentaram inibição superior a 90%. O ESMS revelou um resultado promissor, inibindo 87,06% da produção do $O_2^{\cdot-}$. Ainda que o ESMC tenha apresentado resultado inferior (63,69%), manteve-se dentro da variação observada por Lemos et al. (2022), com inibições em torno de 40% a 80%, de diferentes genótipos de grãos de *C. canephora*.

Entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é considerado crucial nos estágios iniciais e no desenvolvimento da inflamação (LI et al., 2012). O TNF- α associado ao estresse oxidativo contribuem para o ciclo da resposta inflamatória e para a transdução de sinalização pró-inflamatória (LI et al., 2012). Logo, compostos que podem interferir na atividade do TNF- α e no estresse oxidativo desempenham um papel importante na manutenção da homeostase celular e tecidual. De acordo com os resultados obtidos, observou-se um efeito inibitório significativo de 31,99% para ESMS e 37,12% para ESMC, na produção de TNF- α a 10 µg/mL. Estes valores corroboram com os achados de Lemos et al. (2022), onde os extratos de diferentes genótipos de *C. canephora*, apresentaram inibição variando de 25% a 70%.

Conforme observado neste estudo, a inflamação e o estresse oxidativo são processos fisiopatológicos intimamente relacionados. A presença de EROs

e de citocinas inflamatórias, contribuem para o envelhecimento inflamatório na pele provocando alterações no tecido (GOKCEN, 2022). Por consequência, o processo de envelhecimento cutâneo intrínseco é intensificado. Neste cenário, o número de fibroblastos é reduzido, e a capacidade de síntese de colágeno e elastina é diminuída. Diante disso, a derme torna-se atrófica (GU et al., 2020; KHAVKIN; ELLIS, 2011). Na epiderme, a renovação celular também diminui, a cicatrização de feridas se torna mais lenta e descamação da pele menos eficaz (KHAVKIN; ELLIS, 2011). Todo esse contexto favorece o aumento das rugas, a perda de elasticidade e a fragilidade desse tecido, a pele se torna seca, sua função é comprometida e, portanto, o risco de doenças é aumentado (GU et al., 2020).

O potencial das células-tronco vegetais na melhora da qualidade da pele vem sendo avaliado (BIMONTE et al., 2011; TITO et al., 2011). O estudo de Bimonte et al. (2011) constatou que extratos de células-tronco da espécie *Coffea bengalensis* foi capaz de induzir a síntese de colágeno em fibroblastos em cultura e apresentou efeitos antirrugas. Neste estudo, foi demonstrado que os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* contribuem significativamente para a proliferação e migração de fibroblastos. O ESMS destacou-se pelo potencial de proliferação celular no ensaio BrDU, uma vez que densidade óptica da cultura dobrou quando comparado ao controle, na concentração de 1000 µg/mL. Por outro lado, no ensaio do *scratch*, que avalia não só a proliferação como também a migração celular, o ESMC apresentou um resultado promissor, visto que aumentou o número de células para 64,89% na concentração de 1000 µg/mL, enquanto o controle positivo aumentou apenas 50,35%. Estes dados demonstram que os extratos de suspensões celulares de *C. canephora* podem ser uma estratégia promissora para o aumento do número de fibroblastos contribuindo para regeneração tecidual e integridade de uma pele saudável.

6. CONCLUSÃO

Os ESMS e ESMC demonstram um teor relevante de metabólitos primários e secundários que podem contribuir para uma melhora da qualidade da pele. Com base nos resultados obtidos, constatamos que os extratos poderão contribuir com a síntese de fatores de crescimento e de proteínas da pele

produzidas pelos fibroblastos, incluindo colágeno e a elastina atribuída a presença dos aminoácidos glicina e prolina.

Além disso, os extratos possuem a capacidade de eliminação de radicais livres diminuindo o estresse oxidativo. Estas propriedades biológicas podem ser atribuídas aos compostos fenólicos emodina e a esculina, metabólitos secundários majoritários presentes nos extratos estudados. Além disso, os extratos têm a capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios como $O_2^{\cdot-}$, NO e TNF- α , evidenciando sua atuação na modulação de processos inflamatórios e estresse oxidativo.

Ambos os extratos também têm ação estimuladora de fibroblastos, aumentando a migração e a proliferação celular, contribuindo para a regeneração tecidual e integridade de uma pele saudável.

Desta forma, os extratos se mostraram promissores para o desenvolvimento de um novo produto cosmético, tendo cada extrato suas particularidades. Contudo, mais estudos precisam ser realizados no sentido de determinar qual extrato apresenta melhor desempenho na prevenção ou no reparo tecidual durante o envelhecimento cutâneo.

7. AGRADECIMENTOS

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

8. REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. Superoxide and nitric oxide in senescence and aging. **Frontiers in Bioscience**, v. Volume, n. 14, p. 3899, 2009.

AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3782–3788, 2009.

ALBAUGH, V. L.; MUKHERJEE, K.; BARBUL, A. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 11, p. jn256404, 4 out. 2017.

ANANTHARAJU, P. G. et al. An overview on the role of dietary phenolics

for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2016.

ARULSELVAN, P. et al. Anti-Inflammatory Potential of Ethyl Acetate Fraction of *Moringa oleifera* in Downregulating the NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1452, 31 out. 2016.

BABICH, O. et al. Modern Trends in the In Vitro Production and Use of Callus, Suspension Cells and Root Cultures of Medicinal Plants. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 1–18, 2020.

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33–39, mar. 2016.

BARBULOVA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. **Cosmetics**, v. 1, n. 2, p. 94–104, 2014.

BAYR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. Suppl, p. S498–S501, dez. 2005.

BELTRESCHI, L.; DE LIMA, R. B.; DA CRUZ, D. D. Traditional botanical knowledge of medicinal plants in a “quilombola” community in the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 21, n. 3, p. 1185–1203, 11 jun. 2019.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIMONTE, M. et al. *Coffea bengalensis* for antiwrinkle and skin toning applications. **Cosmetics and toiletries**, v. 126, p. 644–650, 2011.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BÖTTGER, A. et al. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. In: Learning Materials in Biosciences. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 143–152.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, jun. 2011.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. DE; CARDOSO, F. DE C. I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, jun. 2019.

CHEN, J. et al. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 43, n. 5, p. 495–509, 28 out. 2021.

CHEN, X. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 1008–1025, 2019.

CHERUBIM, D. J. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33–37, 7 jan. 2020.

CHOI, H. W.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Histórico Semanal Café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-de-conjunturas-de-cafe>>. Acesso em: 18 jun. 2021a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 18 jun. 2021b.

CSEKES, E.; RAČKOVÁ, L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

DAVIS, A. P. et al. High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. **Science Advances**, v. 5, n. 1, p. eaav3473, 16 jan. 2019.

DELGADO, A. M.; ISSAOUI, M.; CHAMMEM, N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 5, p. 1356–1364, 1 set. 2019.

EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50–59, 2019.

ESQUIVEL-ALVARADO, D. et al. Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical Vaccinium Species from Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2872–2879, 2020.

EVANS, D. E.; COLEMAN, J. O. D.; KEARNS, A. **Plant Cell Culture**. 1. ed. Londres: Taylor & Francis, 2020.

FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. April, p. 1–11, 26 abr. 2019.

FERRÃO, R. G. et al. **Café Conilon**. 2. ed. Vitória, ES: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural Rua, 2017.

FRONZA, M. et al. The scratch assay: A suitable in vitro tool for studying wound healing effects. **Planta Medica**, v. 74, n. 09, jul. 2008.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 29 ago. 2016.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. 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 and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 1–18, 5 jul. 2016.

GOKCEN, N. Inflamm-aging: a mechanism of aging that contributes to the characteristics of skin involvement in systemic sclerosis. **Anti-Aging Eastern Europe**, v. 1, n. 1, p. 47–51, 28 jun. 2022.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GU, Y. et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 59, n. December 2019, p. 101036, maio 2020.

GUIDONI, M. **Atividade do extrato de suspensões de células tronco vegetal de Coffea canephora sobre o processo de envelhecimento e regeneração da pele**. Universidade Vila Velha, 2022.

GUIDONI, M. et al. Liposomal stem cell extract formulation from Coffea canephora shows outstanding anti-inflammatory activity, increased tissue repair, neocollagenesis and neoangiogenesis. **Archives of Dermatological Research**, p. 1–23, 17 set. 2022.

HAMON, P. et al. Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (Coffea) and insights into the evolution of caffeine content in its species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 109, p. 351–361, abr. 2017.

HAQUE, A.; WOOLERY-LLOYD, H. Inflammaging in Dermatology: A New Frontier for Research. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 144–149, 1 fev. 2021.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, maio 2015.

HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703–714, 7 jul. 2010.

JUNG, S. et al. Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 6, p. 626–635, 2017.

KABERA, J. N. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 377–392, set. 2014.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KIEU TRAN, T. M. et al. Effects of drying on physical properties, phenolic compounds and antioxidant capacity of Robusta wet coffee pulp (*Coffea canephora*). **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04498, jul. 2020.

LEMOS, M. F. et al. Chemical and sensory profile of new genotypes of Brazilian *Coffea canephora*. **Food chemistry**, v. 310, p. 125850, 25 abr. 2020.

LEMOS, M. F. et al. Chlorogenic acid and caffeine contents and anti-inflammatory and antioxidant activities of green beans of conilon and arabica coffees harvested with different degrees of maturation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 101467, maio 2022.

LI, C. XIAO et al. The pharmacological and pharmacokinetic properties of esculin: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 6, p. 2434–2448, 2022.

LI, J. et al. TNF- α ; Inhibitors with Anti-Oxidative Stress Activity from Natural Products. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1408–1421, 1 jul. 2012.

LI, P.; WU, G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in

collagen synthesis and animal growth. **Amino Acids**, v. 50, n. 1, p. 29–38, 20 jan. 2018.

LIAO, Y. et al. Absolute Quantification of Human Milk Caseins and the Whey/Casein Ratio during the First Year of Lactation. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 11, p. 4113–4121, 3 nov. 2017.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018.

LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479–496, 7 jan. 2010.

LIU, J. et al. Identification and quantification of target metabolites combined with transcriptome of two rheum species focused on anthraquinone and flavonoids biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

LORENÇONI, M. F. et al. Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 39, n. January, 2021.

LUTZ, M. et al. Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 366, 21 jan. 2019.

MAN, M.-Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, v. 45, n. 3, p. 949–964, 30 jun. 2022.

MCCOOK, S. Environmental History of Coffee in Latin America. In: **Oxford Research Encyclopedia of Latin American History**. [s.l.] Oxford University Press, 2017. p. 1–24.

MIASTKOWSKA, M.; SIKORA, E. Anti-aging properties of plant stem cell extracts. **Cosmetics**, v. 5, n. 4, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

NAKAI, K.; TSURUTA, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10799, 6 out. 2021.

NIGRA, A. D. et al. Antitumor Effects of Freeze-Dried Robusta Coffee

(*Coffea canephora*) Extracts on Breast Cancer Cell Lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–16, 18 maio 2021.

OCHOA-VILLARREAL, M. et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, n. 3, p. 149–158, 31 mar. 2016.

OWCZAREK, A. et al. Potential activity mechanisms of aesculus hippocastanum bark: Antioxidant effects in chemical and biological in vitro models. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, 2021.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 15 jan. 2015.

PINHEIRO, F. DE A. et al. Arabica and Conilon coffee flowers: Bioactive compounds and antioxidant capacity under different processes. **Food Chemistry**, v. 336, n. July 2020, p. 127701, 30 jan. 2021.

PINHO, B. R. et al. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 5 jun. 2018.

RAHMAN, M. M. et al. Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 233, 30 dez. 2021.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, dez. 2010.

REZENDE, J. C. et al. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 93–98, 29 nov. 2012.

RINNERTHALER, M. et al. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545–589, 2015.

SILVA, M. R. et al. Metabolite characterization of fifteen by-products of the

coffee production chain: From farm to factory. **Food Chemistry**, v. 369, p. 130753, fev. 2022.

RODRIGUES, N. P.; SALVA, T. D. J. G.; BRAGAGNOLO, N. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the in Vitro Capacity To Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4815–4826, 20 maio 2015.

RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, L. et al. Fatty Acid Profile, Phenolics and Flavonoids Contents in *Olea europaea* L. Callus Culture cv. *cornicabra*. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 5, p. 525–529, 2018.

SEMWAL, R. B. et al. Emodin - A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. **Phytochemistry**, v. 190, n. May, p. 112854, 2021.

SOLANO, F. Metabolism and Functions of Amino Acids in the Skin. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1265p. 187–199.

SOUZA, A. C. DE et al. Indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. CV. Catuaí amarelo. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2015.

STURROCK, A. et al. Transforming growth factor- β 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 4, p. 661–673, 2006.

SUZUMURA, K.; YASUHARA, M.; NARITA, H. Superoxide Anion Scavenging Properties of Fluvastatin and Its Metabolites. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 1477–1480, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5^a ed. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.

TITO, A. et al. A tomato stem cell extract, containing antioxidant compounds and metal chelating factors, protects skin cells from heavy metal-induced damages. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 6, p. 543–552, 2011.

TRÜEB, R. M. Oxidative stress and its impact on skin, scalp and hair. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 43, n. S1, p. S9–S13, 2021.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The**

Journal of Physiology, v. 552, n. 2, p. 335–344, 15 out. 2003.

VALGIMIGLI, L.; GABBANINI, S.; MATERA, R. CHAPTER 26: Analysis of Maltose and Lactose by U-HPLC-ESI-MS/MS. In: [s.l: s.n.]. p. 443–463.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Funct.**, v. 5, n. 2, p. 189–197, 2014.

VENIAL, L. R. et al. Autotetraploid *Coffea canephora* and Auto-Alloctaploid *Coffea arabica* From In Vitro Chromosome Set Doubling: New Germplasms for *Coffea*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. March, p. 1–12, 2020.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 469–473, mar. 2011.

WANG, Y. et al. Metabolic profile of esculin in rats by ultra high performance liquid chromatography combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1020, p. 120–128, maio 2016.

WONGSA, P. et al. Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spray-dried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, n. May 2018, p. 579–587, jun. 2019.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 27 mar. 2018.

YUE, W. et al. Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 215–232, 2016.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, abr. 2016.

ZHANG, S.; DUAN, E. Fighting against Skin Aging. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 5, p. 729–738, 25 maio 2018.