

Metabolomica utilizando CLAE-DAD-EM como ferramenta na análise de ácido clorogênico em folhas e calos de *Hibiscus sabdariffa* Linn

Metabolomics using HPLC-DAD-EM as a tool in the analysis of chlorogenic acid in leaves and callus of *Hibiscus sabdariffa* Linn

Alessandra Carla Guimarães Sobrinho¹, Ricardo Felipe Alexandre de Mello¹, Alberdan Silva Santos¹

¹Universidade Federal do Pará

Resumo

O *Hibiscus sabdariffa* Linn. é uma espécie naturalizada no Brasil comumente chamada de vinagreira, é um membro da família Malvaceae, apresentando compostos com propriedades farmacológicas de grande interesse para a indústria, a exemplo, o ácido clorogênico. O ácido clorogênico é um composto presente na espécie com propriedades farmacológicas importantes, atuando como agente terapêutico em diversas disfunções, tais como, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidade e esteatose hepática. Nesse sentido é de grande importância a produção deste composto através de alternativas promissoras. A cultura de calos *in vitro* de plantas medicinais é uma ferramenta biotecnológica promissora que fornece condições ambientais estéreis e controladas para a produção de compostos medicinais com alta qualidade diferentemente do cultivo *in natura*. Assim o artigo teve como objetivo investigar a presença de ácido clorogênico nas folhas *in natura* e na cultura de calos *in vitro* de *Hibiscus sabdariffa* L., através do método analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os resultados demonstraram que a ferramenta analítica foi capaz identificar o ácido clorogênico, além disso, os resultados obtidos para a cultura de calos da *Hibiscus sabdariffa* L. promoveu a produção do ácido clorogênico, sendo uma ferramenta biotecnológica valiosa para a produção sustentável.

Palavras-chave: Hibiscus, ácido clorogênico, folhas, calos *in vitro*, CLAE.

Abstract

The *Hibiscus sabdariffa* Linn. is a naturalized species in Brazil commonly called a vinagreira, is a member of the Malvaceae family, presenting compounds with pharmacological properties of great interest to the industry, for example, chlorogenic acid. Chlorogenic acid is a compound present in the species with important pharmacological properties, acting as a therapeutic agent in several dysfunctions, such as, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, obesity and fatty liver. In this sense, the production of this compound through promising alternatives is of great importance. The *in vitro* callus culture of medicinal plants is a promising biotechnological tool that provides sterile and controlled environmental conditions for the production of medicinal compounds with high quality unlike *in natura* cultivation. Thus, the objective of this article was to investigate the presence of chlorogenic acid in fresh leaves and *in vitro* callus culture of *Hibiscus sabdariffa* L., using the High Performance Liquid Chromatography analytical method. The results showed that the analytical tool was able to identify chlorogenic acid, in addition, the results obtained for the callus culture of *Hibiscus sabdariffa* L. promoted the production of chlorogenic acid, being a valuable biotechnological tool for sustainable production

Keywords: Hibiscus, chlorogenic acid, leaves, *in vitro* callus, CLAE.

Introdução

Hibiscus sabdariffa Linn. conhecida como vinagreira, pertence à família Malvaceae, é uma espécie que contém metabólitos farmacologicamente ativos promotores da saúde, com propriedades anti-diabéticas, anti-hipertensivas, de redução do colesterol, anti-obesidade, proteção imunomodulatória, diurética e renal ^[1-3]. Dentre esses metabólitos promotores da saúde presentes na *Hibiscus sabdariffa* L., têm-se os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos, cuja produção é induzida em resposta às condições adversas de estresse ambiental ^[4], apresentando capacidade de sequestrar espécies reativas, como a radical hidroxila e o oxigênio singlete ^[5].

O ácido clorogênico proporciona um extenso espectro de propriedades biológicas, podendo modular as trocas lipídicas e de glicose em distúrbios metabólicos e atuando como agente terapêutico em doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidade e esteatose hepática ^[6]. São poucos os trabalhos científicos que relatem a determinação de ácido clorogênico em plantas *in natura* especificamente nas folhas da *Hibiscus sabdariffa* L. e a capacidade de produção desse composto através da cultura de células *in vitro*, em especial a cultura de calos. A cultura de calos segue duas etapas importantes para a produção desse metabólito secundário. Primeiramente, o acúmulo de biomassa através do crescimento e multiplicação dos calos e, em seguida, ocorre a biossíntese desses metabólitos da biomassa ^[7]. A cultura de calos é uma ferramenta biotecnológica importante para a produção de metabólitos secundários ^[1]. Esta ferramenta foi proposta como uma alternativa para produzir metabólitos secundários de plantas cuja disponibilidade é limitada, podendo manter ou aumentar as propriedades medicinais da espécie *in vitro* ^[8, 9].

Nesse sentido o presente estudo teve como finalidade a investigação do ácido clorogênico nas folhas *in natura* e na cultura de calos *in vitro* da *Hibiscus sabdariffa* L. utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com um Detector de Arranjo de Diódos (DAD) e acoplado ao Espectro de Massas (EM) que é uma ferramenta metabolômica que possibilita a obtenção de espectros completos na região do ultravioleta/visível durante a corrida cromatográfica ^[10, 11], permitindo através do espectro de massas a identificação da massa molecular dos constituintes das amostras, sendo a escolha da técnica baseada no preparo menos destrutivo da amostra ^[12], o que a torna um método conveniente e rápido de aplicação ^[13], devido à rápida transferência de massa, alta resistência mecânica e alta capacidade de separação ^[14].

Na Figura 1 abaixo, observa-se o resumo gráfico do desenvolvimento da pesquisa.

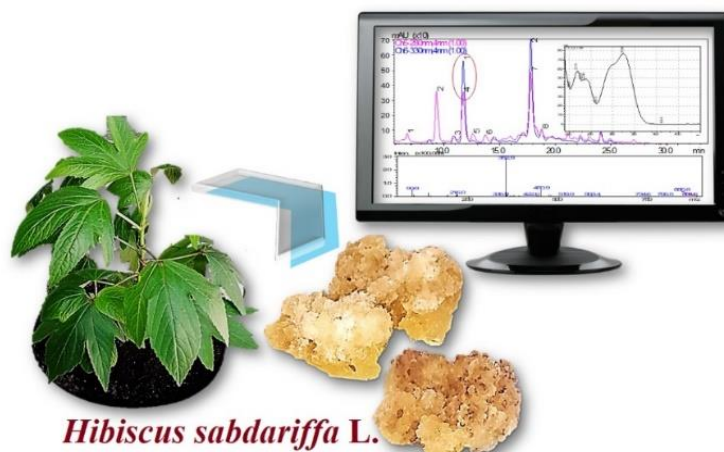


Figura 1: Representação das folhas *in natura* e calos *in vitro* da *Hibiscus sabdariffa* Linn. na investigação do ácido clorogênico através da técnica de CLAE-DAD-EM.

Material e Métodos

Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes empregados nas análises das amostras por CLAE-DAD-EM consistiam em: água ultrapura Milli-Q, sulfato de sódio PA (> 99%), ácido clorídrico e solventes de grau espectroscópico de pureza incluindo, acetonitrila, ácido fórmico (Tedia Brasil).

Coleta das amostras de folhas

Foram utilizadas folhas de *Hibiscus sabdariffa* L. coletadas na a Vila de Pau D'Arco município de Santa Bárbara do Pará, estando a matriz localizada na área com as seguintes coordenadas geográficas S: 1° 15' 3,88"; O: 48° 16' 36,8, com registro de atividades de acesso ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AF05B99. Após a colheita, das folhas foram higienizadas em água corrente e transportadas até o Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (*LabISisBio.*), localizado na Rua Augusto Correa, 01, Guamá, 66075-110 Belém, PA, da Universidade Federal do Pará.

Condições da cultura de calos

Para o processo de indução de calos foi utilizado o meio de cultura Murashige e Skoog (MS) com formulações minerais e vitamínicas do meio básico (Tabela 1).

Tabela 1: Composição nutricional do meio básico Murashige e Skoog (1962) ^[15] em mg.L⁻¹

Composição do meio de cultura MS (mg.L ⁻¹)			
<i>Macronutrientes</i>		<i>Micronutrientes</i>	
NH ₄ NO ₃	1.650	MnSO ₄ .H ₂ O	22.3
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
(NH ₄) ₂ SO ₄		H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	1.900	KI	0.83
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	-	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0.025
<i>Fe- EDTA</i>		<i>Vitaminas</i>	
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	Tiamina – HCl (B1)	0.1
Na ₂ EDTA	37.3	Piridoxina - HCl	0.5
<i>Cálcio</i>		Ácido Nicotínico	0.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	-	Glicina	2
<i>Fonte de carbono</i>		Mio- Inositol	100
Sacarose	30.000	<i>pH</i>	5.8

Fonte: Autora, (2020).

O meios de cultura MS, foram suplementados com 30 g. L⁻¹ de sacarose, solidificado com Phytigel 0,2 % nas concentrações de reguladores de crescimento, de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), com o pH do meio ajustado para 5,8, o sistema foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Foram utilizados explantes de hipocótilos de *Hibiscus sabdariffa* L., oriundos do cultivo axênico. Os explantes foram fragmentados (1 cm) e seus segmentos inoculados, sendo utilizado quatro seguimentos de cada explante em um único frasco de cultura (5 cm x 10 cm), contendo 40 ml do meio de cultura MS em um total de duas repetições e mantido em incubadora tipo B.O.D a 30°C com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de 90 µmol.m⁻².s⁻¹ por 120 dias, o ensaio experimental foi oriundos do estudo de acúmulo de biomassa.

Processamento das amostras e preparação dos extratos

As folhas coletadas e higienizadas *in natura* e os calos hipocotiledonares *in vitro* de *Hibiscus sabdariffa* L. foram desidratados em estufa de circulação de ar a temperatura constante de 50°C, durante 48 horas. Após a desidratação as amostras foram pulverizadas com auxílio de um pistilo e grau.

Para o procedimento de retirada de constituintes bioativos de interesse presentes nas folhas e calos desidratados e pulverizados de *Hibiscus sabdariffa* L., pesou-se separadamente 100 mg de cada material vegetal em um erlenmeyer de 100 ml, adicionou-se 40ml de ácido clorídrico 4M, esse sistema foi mantido em chapa aquecedora sob agitação a temperatura de 120 °C por 2 horas em sistema fechado. Após o processo de extração sólido-líquido a quente, os extratos foram filtrados com auxílio de um papel filtro, esse procedimento foi realizado em triplicata, ao termino das extrações evaporou-se os extratos em câmara de exaustão.

Preparação dos extratos para análise cromatográfica

Pesou-se 10 mg de extrato seco das folhas e 10 mg de extrato seco de calos. Cada amostra foi reconstituída com 5 ml de água MiliQ e sonificados por 10 minutos em máquina ultrassônica a temperatura de 25 °C. Por fim, as soluções das amostras foram filtradas através de um filtro de seringa de 0,22 µm (PVDF- Tedia). O filtrado foi recolhido em *vials* para a análise em CLAE-DAD-EM.

Instrumento e condições do CLAE-DAD-EM

As análises por CLAE foram realizadas utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a um detector Uv-Vis de arranjo de fotodiodos (Shimadzu, Proeminence Ultra fast liquid chromatographic mod. CBM-20) com autoamostrador (Shimadzu, SIL-20). Equipado com um sistema de bombas quaternárias (Shimadzu, DGU-20A), desgaseificador operando *on line* e sistema de aquisição e processamento de dados LCMS-Solutions (Shimadzu). A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 Shim-pack VP-ODS 150x 2mm (Shimadzu), a uma temperatura em forno de 28°C. Os espectrômetros de massa foram adquiridos em modo positivo e negativo no modelo LC-MS 2010 EV, com faixa de varredura de m/z 50 a 900. A voltagem da agulha foi de 1,5 kV, a taxa de fluxo de nitrogênio (99,999%) foi de 1,5 L / min. A faixa de varredura espectral do detector foi de 200 e 800 nm e os comprimentos de onda de detecção monitorados foram 280 e 330 nm. A fase móvel foi constituída em 0,1% de ácido fórmico (P.A.-A.C.S.) em água (ultrapura) e acetonitrila (grau espectroscópico), sendo solução A e solução B, respectivamente. Na separação foi utilizado o método de gradiente de 5 a 10% de B em 0 a 10 minutos, de 10 a 34% de B em 10 a 34 minutos, de 34 a 60% de B em 34 a 35 minutos e mantém-se em 60% de B a 50 minutos. A um fluxo de fase móvel de 0,1890 ml / min. Sessenta minutos foi o tempo total de execução resultante, devido ao acondicionamento da coluna por 10 min, com um volume de injeção de amostra foi de 10 µL. Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção, bem como por comparação entre o espectro de UV e EM da literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram obtidas em coluna de fase reversa C18 Shim-pack VP-ODS 150x 2mm (Shimadzu), a uma temperatura de 28 ° C, com eluição gradiente, com uma fase móvel constituída em 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e acetonitrila, sendo solução A e solução B, respectivamente. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,1890, o que permitiu um cromatograma completamente resolvido sem interferências para as análises dos extratos das folhas (A) e dos calos (B) de *Hibiscus sabdariffa* L., com detecção UV a 280nm (1) e 330nm (2) (Figura 2).

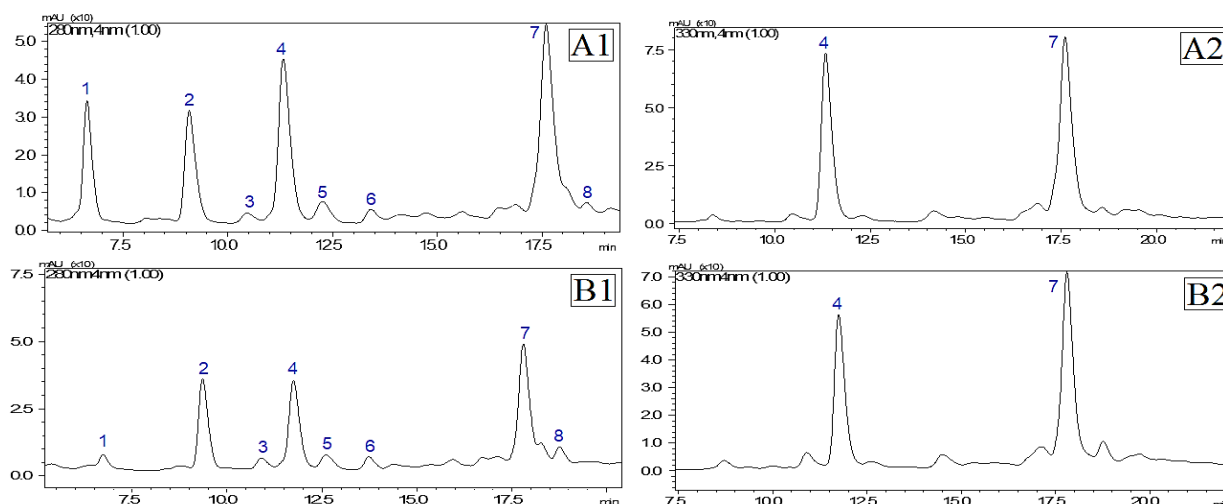


Figura 2: Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM dos extratos de folhas (A) e extratos de calos (B) de *Hibiscus sabdariffa* L. a 280nm (1) e 330 (2) nm. Com a fase móvel de 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e acetonitrila, a uma taxa de fluxo de 0,1890 mL / min.

A Figura 2, apresenta os cromatogramas dos extratos nas condições experimentais definidas. A identificação do ácido clorogênico (composto 4) presente nos extratos de folhas (A) e extratos de calos (B) de *Hibiscus sabdariffa* L. foi feita através dos espectros de UV para ambos os extratos (Figura 3).

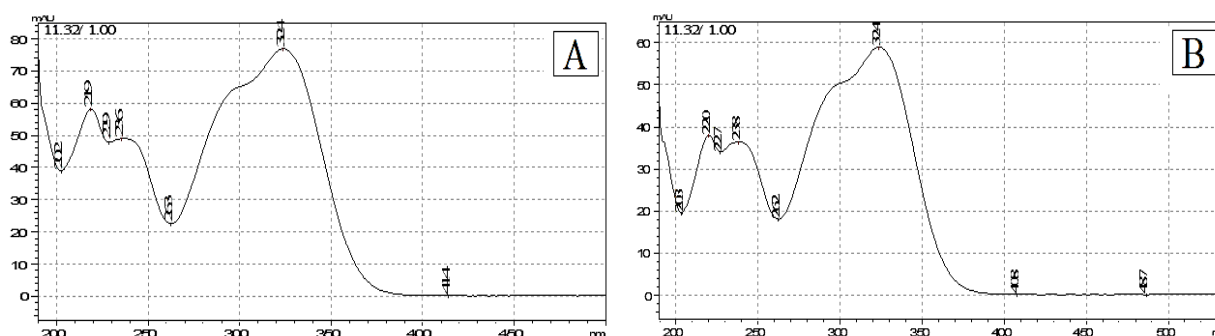


Figura 3: Espectros de UV do composto 4 para extratos das folhas (A) e extratos dos calos (B) da *Hibiscus sabdariffa* L., com a fase móvel de 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e acetonitrila, a uma taxa de fluxo da fase móvel de 0,1890 mL / min.

Nos espectros de UV para os diferentes extratos (Figura 3) é possível observar que existem dois máximos de absorção. O primeiro máximo, que é de menor intensidade, aparece em 219 nm para os extratos de folhas (A) e 220 nm para os extratos de calos (B), o segundo máximo de maior intensidade correspondente está localizado a 324 nm para ambos os extratos, o que demonstra um espectro completamente resolvido de ácido clorogênico. De acordo com Martucci et al., (2014) ^[16] os ácidos

clorogênicos são constituídos por uma unidade de ácido quínico esterificada com um ácido caféico, apresentando máximos de UV de aproximadamente 300 a 325 nm. Além disso, para os autores, os derivados cafeoilquínicos apresentam aproximadamente m/z 353 durante o modo de ionização negativa, o que pode ser observado no estudo para ambos os extratos (Figura 4).

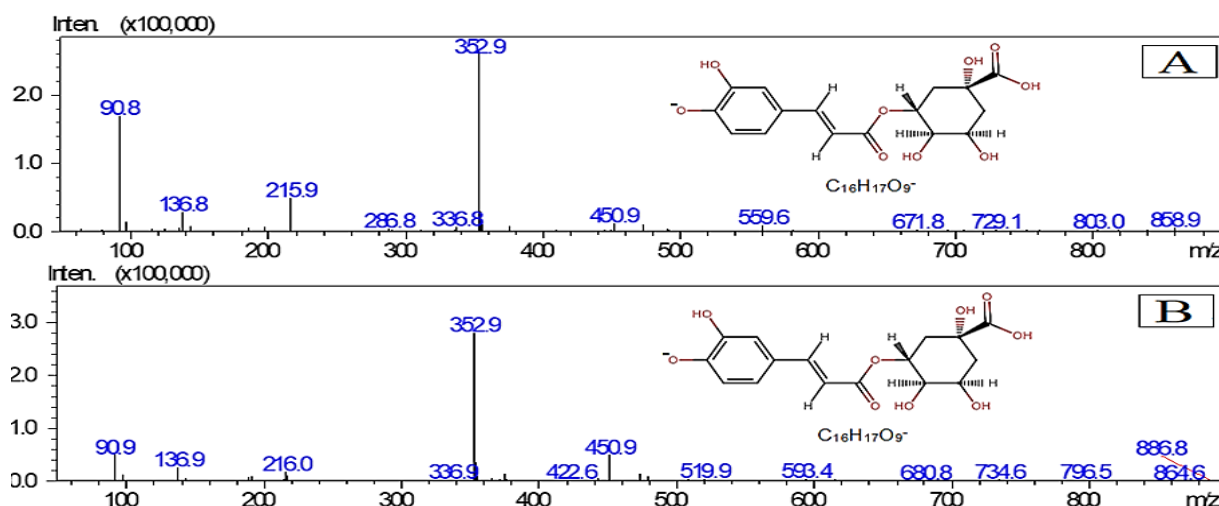


Figura 4: Espectro de massas para ácido clorogênico (pico 4) dos extratos de folhas (A) e calos (B) de *Hibiscus sabdariffa* L. com razão m/z 352,9.

No decurso da análise utilizando o analisador de massa de alta resolução foi possível a confirmação o íon de produto mais abundantes de m/z 352,9 para ambos os extratos, como evidenciado na Figura 4. O ácido clorogênico, apresenta massa molecular de aproximadamente 354 g/mol, devido os grupos ácidos, e sendo a ionização realizada em modo negativo, resultou em um razão m/z 352,9 ou 353 que é correspondente à massa molecular do ácido clorogênico desprotonado ($[M - H]^-$) para o pico 4, sendo fundamentado pelo relatório de Simirgiotis (2015)^[17] e Tyc et al., (2016)^[18].

O ácido clorogênico apresenta propriedades promotoras da saúde, alguns estudos propõe mecanismos para explicar como o ácido clorogênico exerce seus efeitos positivos em distúrbios associados como a obesidade, evidenciando que o ácido clorogênico é capaz de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo consumo uma dieta rica em gordura, suprimindo a expressão da inflamação e, conseqüentemente, reduzindo o acúmulo de gordura^[19]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2020, a obesidade no mundo triplicou se comparada com o ano de 1975, e segundo a organização a obesidade aumenta o risco de uma série de doenças, sendo a causa principal da obesidade o desequilíbrio energético entre a ingestão e o gasto de calorias^[20].

A ingestão de ácido clorogênico pode promover a redução significativa do peso corporal, sendo considerada uma biomolécula capaz mitigar a obesidade^[21]. Assim, o CLAE-DAD-EM provou ser uma abordagem poderosa e rápida para observação do ácido clorogênico tanto para a espécie *in natura* como para os calos *in vitro*. Além disso, o sistema de cultura de calos forneceu este composto de forma

independente, ou seja, sem interferentes externos como sazonalidade ou microorganismos, o que segundo Efferth (2019) ^[22], promove a produtividade dos compostos de forma vantajosa e sustentável com a extração dos compostos diretamente dos calos sem sacrificar a planta inteira. Além disso, o autor afirma que a cultura de calos possibilita a manipulação das vias de biossíntese de células vegetais de forma a produzir metabólitos secundários com recursos aprimoradas para o mercado.

Considerações Finais

Os resultados demonstraram que a metabolômica utilizando a CLAE-DAD-EM é uma ferramenta analítica que se mostrou simples, rápida e confiável, fornecendo uma alta sensibilidade e resolução na identificação do ácido clorogênico. Além disso, os resultados obtidos para a produção *in vitro* do *Hibiscus sabdariffa* L. através da cultura de calos possibilitou a produção do ácido clorogênico, abrindo novos campos de aplicação para a espécie possibilitando uma alternativa na produção deste composto, sob um ambiente controlado e livres de contaminação, sendo um sistema que está entre as tecnologias de ponta para a produção de compostos secundários, garantindo as qualidades farmacológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Pará, ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- PPG BIONORTE (Polo-Museu Paraense Emílio Goeldi) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- [1] IFIE, I. *Hibiscus sabdariffa*: An Underutilised Powerhouse of Plant Bioactives. **Journal of Agriculture and Food Environment**, v. 5, n. 2, p. 16-28, 2018.
- [2] MAYASARI, N. R.; SUSETYOWATI; WAHYUNINGSIH, M. S. H.; PROBOSUSENO. Antidiabetic Effect of Rosella-Stevia Tea on Prediabetic Women in Yogyakarta, Indonesia. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 373-379, 2018.
- [3] MOHAMMED B.; AHMED H. A.; SHEKOUFEH, N.; MOHSEN A.; MOHAMMAD A. The Antidiabetic and Antilipidemic Effects of *Hibiscus Sabdariffa*: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials, **Food Research International**, 2020.
- [4] ROBBINS, R. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.
- [5] MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

- [6] NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; KAMBOH, A. A.; KHAN, G. J.; SHUMZAID, M.; et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 67-74, 2018.
- [7] CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K. D. Q.; SOUSA, F. M. D.; COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 143-151, 2016.
- [8] YEW, C. K.; BALAKRISHNAN, B.; SUNDASEKARAN, J.; SUBRAMANIAM, S. The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 4, n. 24, p. 2641-2646, 2010.
- [9] PARK, D. E. Preparation and characterization of Callus extract from *Pyrus pyrifolia* and investigation of its effects on skin regeneration. **Cosmetics**, v. 5, n. 71, 2018.
- [10] RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista Multiciência**, v. 7, p. 7-14, 2006
- [11] MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.
- [12] SMITH, M. J.; HOLMES-SMITH, A. S.; LENNARD, F. Development of non-destructive methodology using ATR-FTIR with PCA to differentiate between historical Pacific barkcloth. **Journal of Cultural Heritage**, 2019.
- [13] HUA, R.; SUN, S. Q.; ZHOU, Q.; NODA, I.; WANG, B. Q. Discrimination of Fritillary according to geographical origin with Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation IR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 199-209, 2003.
- [14] LIU, H.; XU, B.; RAY, M. K.; SHAHROKH, Z. Peptide mapping with liquid chromatography using a basic mobile phase. **Journal Chromatography A**, v. 1210, p. 76-83, 2008.
- [15] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, **Copenhagen**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- [16] MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C. H.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia Schreb*. **PLoS ONE**, v. 9, e93149, 2014.
- [17] SIMIRGIOTIS, M. J.; BENITES, J.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490-507, 2015.
- [18] TYC, O.; TOMA'S-MENOR, L.; GARBEVA, P.; BARRAJÓN-CATALA'N, E.; MICOL, V. Validation of the AlamarBlue® Assay as a Fast Screening Method to Determine the Antimicrobial Activity of Botanical Extracts. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, e0169090, 2016.
- [19] SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D.A. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 358-378, 2017.
- [20] WHO, Obesity and overweight, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em novembro de 2020.

[21] VAIBHAVI, P.; SIDDHI, P.; KARTIKEYA, S.; NIVAS, D.; PUSHPA S. M. The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2020.

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