



**ADRIANE DUARTE COELHO**

**CRESCIMENTO *in vitro* E ACÚMULO DE COMPOSTOS  
ANTIOXIDANTES DE *Urtica dioica* L. MICROPROPAGADAS  
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE VENTILAÇÃO  
NATURAL E LUMINOSIDADE**

**LAVRAS - MG  
2019**

**ADRIANE DUARTE COELHO**

**CRESCIMENTO *in vitro* E ACÚMULO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE  
*Urtica dioica* L. MICROPROPAGADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
VENTILAÇÃO NATURAL E LUMINOSIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Coelho, Adriane Duarte.

Crescimento *in vitro* e acúmulo de compostos antioxidantes de *Urtica dioica* L. micropropagadas sob diferentes condições de ventilação natural e luminosidade/ Adriane Duarte Coelho. - 2019. 93 p.: il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Urtiga. 2. Espectro de luz. 3. Sistemas de cultivo. I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III. Título.

**ADRIANE DUARTE COELHO**

**CRESCIMENTO *in vitro* E ACÚMULO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE  
*Urtica dioica* L. MICROPROPAGADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
VENTILAÇÃO NATURAL E LUMINOSIDADE**

***In vitro* GROWTH AND ACCUMULATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF  
*Urtica dioica* L. MICROPROPAGATED UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF  
NATURAL VENTILATION AND LIGHT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2019.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Pereira Botrel  
Prof. Dr. Manuel Losada Gavilanes

UFLA  
IF- SUL DE MINAS  
UFLA

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Em especial, aos meus pais Antônio e Heloisa, por todo o apoio, amor incondicional e carinho em todas as fases, decisões e etapas da minha vida. Não poderia ser mais grata ao Universo por ter me colocado nas mãos de duas pessoas tão maravilhosas quanto vocês.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG) e ao Setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, em especial ao Laboratório de Fitoquímica, pela disponibilidade, estrutura e oportunidade.

Ao Prof. José Eduardo, pelo carinho, amizade, ensinamentos de vida e pela inspiração que me faz apaixonar a cada dia pelo cultivo e pela fisiologia das plantas *in vitro*. Seus ensinamentos mudaram a minha forma de enxergar o mundo ao meu redor. Serei sempre grata.

À Prof<sup>a</sup>. Suzan, por me apresentar a este encantador mundo das plantas medicinais, pela orientação, carinho, inspiração e por toda a disponibilidade em todos os momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, à CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Alexandre, por toda atenção, auxílio, esclarecimentos e ensinamentos.

As minhas irmãs, Andréa e Alessandra, e a todos os meus amigos e irmãos que a vida me deu, em especial a Lucas Silvério, Fernanda Salgado, Kamila Ellen e Guilherme Volpe, por me estimularem a seguir sempre em frente e estar comigo sempre que preciso, mesmo que na distância física.

A todos os colegas de Laboratório de Cultura de Tecidos e Fitoquímica, por toda ajuda, risadas e pela amizade, em especial à Diene e Camila, pelo apoio e ajuda no estabelecimento *in vitro* da urtiga.

A Marli, secretária do Programa de Fitotecnia, pelo carinho, disponibilidade e paciência. Ao Evaldo, Anete, Dico, Paulinho e Giulia, pelo carinho e por sempre estarem dispostos a ajudar em todos os momentos.

A todos os amigos que me proporcionaram sempre os melhores momentos em Lavras. Vou levar sempre comigo todos os sorrisos e todo o carinho! Fico feliz em dizer que vocês se tornaram minha família!

Agradeço, em especial, ao meu avô Genuíno (*in memoriam*), por ser o responsável por toda a minha inquietação em conhecer o mundo, a natureza e o Universo.

## RESUMO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae), conhecida popularmente como “urtiga”, é uma planta medicinal explorada pela indústria têxtil, alimentícia e farmacêutica. Recentemente, a espécie tem recebido atenção de pesquisadores por apresentar evidências de atividade anticancerígena, em razão de seus compostos antioxidantes. A intensidade, qualidade de luz e o tipo de sistema de cultivo são fatores que influenciam diretamente o crescimento e o metabolismo secundário das plantas medicinais. Dessa forma, neste estudo, objetivou-se avaliar diferentes intensidades, qualidades de luz e o uso do sistema de ventilação natural no crescimento e no acúmulo de compostos secundários em plântulas de *U. dioica* micropropagadas. No experimento de intensidade de luz, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS sob as irradiâncias 26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtidas com lâmpadas LED. No experimento de qualidade de luz, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS sob lâmpadas LED azul, vermelho, 1 vermelho:1azul; 2,5 vermelho:1 azul; 1 vermelho:2,5 azul; branco e sob lâmpada fluorescente branca fria. No experimento com o sistema de ventilação natural (SVN), segmentos nodais e apicais, com um par de folhas, foram cultivados em meio de cultura MS, na presença e ausência de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram testados 4 tipos de sistemas de cultivo: sistema convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma membrana (SVN1), duas membranas (SVN2) e quatro membranas (SVN4). Após 40 dias, avaliaram-se nos 3 experimentos: crescimento, área foliar, pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante. Plântulas cultivadas sob 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram resultados superiores de crescimento e produção de matéria seca *in vitro*. A produção de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante foi intensificada a 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O uso do LED 1vermelho: 2,5azul proporcionou um aumento de 5,53 vezes na concentração de compostos fenólicos e 8,63 vezes na concentração dos flavonoides em relação ao uso de lâmpadas fluorescentes. O LED 2,5 vermelho:1azul favoreceu o crescimento e acúmulo de matéria seca *in vitro*. O sistema de ventilação natural foi superior ao convencional quanto aos índices de crescimento. Segmentos apicais cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose e uso do SVN1 e SVN2 promoveram os melhores resultados de crescimento *in vitro*. A atividade antioxidante é diretamente influenciada pelo aumento da intensidade da luz. O aumento da proporção de luz vermelha induz o estiolamento da plântula. A adição de sacarose no meio de cultivo promove o enraizamento e acúmulo de flavonoides. A ausência de sacarose induz a produção de matéria seca das folhas na espécie.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos. Sistemas de cultivo. Espectro de Luz. Irradiância. Urtiga. Cultivo *in vitro*.

## ABSTRACT

*Urtica dioica* L. (Urticaceae), popularly known as "stinging nettle", is a medicinal plant exploited by the textile, food, and pharmaceutical industries. Recently, the species has received attention from researchers for presenting evidence of anticancer activity due to its antioxidant compounds. The intensity, light quality and type of cultivation system are factors that directly influence the growth and secondary metabolism of medicinal plants. Therefore, this study aimed to evaluate different intensities, light qualities, and the use of natural ventilation system in the growth and accumulation of secondary compounds in micropropagated *U. dioica* plantlets. In the light intensity experiment, nodal segments were cultured in MS medium under the irradiances 26, 51, 69, 94, and 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtained with LED lamps. In the light quality experiment, nodal segments were grown in MS culture medium under LED lamps: red; blue; 1 red:1blue; 2.5 red:1 blue; 1 red: 2.5 blue; white, and under cold white fluorescent lamp. In the experiment with the natural ventilation system (SVN), nodal and apical segments with a pair of leaves were grown in MS culture medium in the presence and absence of 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. Four types of culture systems were tested: conventional system (SC), natural ventilation system with one membrane (SVN1), two membranes (SVN2) and four membranes (SVN4). After 40 days, the growth, leaf area, dry matter, photosynthetic pigments, total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity were evaluated in all three experiments. Plantlets grown under 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  showed superior growth and dry matter yields *in vitro*. The production of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity was intensified at 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The use of 1 red: 2.5 blue LED provided increased the concentration of phenolic compounds by 5.53 times and 8.63 times in flavonoid concentration, compared to the use of fluorescent lamps. The LED 2.5 red:1blue favored the growth and accumulation of dry matter *in vitro*. The natural ventilation system was superior to the conventional one regarding the indices of growth. Apical segments grown in culture medium supplemented with sucrose and the use of SVN1 and SVN2 promoted the best *in vitro* growth results. The antioxidant activity is directly influenced by the increase in light intensity. Increasing the proportion of red light induces etiolation. The addition of sucrose in the culture medium promotes rooting and flavonoid accumulation. The absence of sucrose induces leaf dry matter production.

**Keywords:** Phenolic compounds. *In vitro* culture. Light spectrum. Irradiance. Nettle. *In vitro* cultivation system.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - A espécie *Urtica dioica* L. (Urticaceae), cultivada em vasos na casa-de-vegetação; B – Face adaxial da folha; C – Face abaxial da folha. .... 17
- Figura 2 - Métodos para a produção de compostos bioativos com uso da cultura de tecidos..... 20
- Figura 3 - Estruturas químicas básicas dos compostos fenólicos. .... 24
- Figura 4 - Rota biossintética de alguns compostos fenólicos pela via do chiquimato..... 25
- Figura 5 - Compostos bioativos encontrados em maior quantidade na *Urtica dioica*. .... 26

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Espectros de luz utilizados no experimento de qualidade de luz. .... 43
- Figura 2 - Plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019..... 49
- Figura 3 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA) dos tratamentos contendo comprimentos de onda azul (A) e vermelho (V) utilizados no experimento com plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019..... 51
- Figura 4 - Matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), total (MST) e razão matéria seca da parte aérea: raiz (MSPA:MSR) de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019..... 51
- Figura 5 - Plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* nas intensidades 26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aos 40 dias. Lavras, 2019..... 55
- Figura 6 - Matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), total (MST) e razão matéria seca da raiz:caule (R:S) de plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019..... 56



### CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Esquema de montagem das membranas porosas utilizadas na montagem do sistema de ventilação natural..... 73
- Figura 2 - Plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais e apicais em meio MS em diferentes sistemas de cultivo: convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro (SVN4) membranas, cultivadas por 40 dias. A e B: com sacarose; C e D: sem sacarose. Lavras, 2019. .... 79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de folhas (NF) e número de segmentos nodais (NSN) de plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. 2019. .... 50
- Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos presentes em plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de segmentos nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. 2019. .... 53
- Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro* sob diferentes intensidades de luz aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 54
- Tabela 4 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 57
- Tabela 5 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, sob diferentes intensidades de luz aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 59

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), total (MST), comprimento da parte aérea (CPA), raiz (CR), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 82
- Tabela 2 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto a matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), total (MST), comprimento da parte aérea (CPA), raiz (CR), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de plântulas de *Urtica dioica* L. cultivadas *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 83
- Tabela 3 - Pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019. .... 84

Tabela 4 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto a concentração de pigmentos fotossintéticos em plântulas de <i>Urtica dioica</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , aos 40 dias. Lavras, 2019. ....	85
Tabela 5 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto aos compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides (F), Capacidade Antioxidante Total (CAT), DPPH e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) dos extratos de plântulas de <i>Urtica dioica</i> L. oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> , aos 40 dias. Lavras, 2019.....	86
Tabela 6 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de <i>Urtica dioica</i> cultivadas <i>in vitro</i> , oriundas de segmentos nodais e apicais sob diferentes sistemas de cultivo e sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019.....	87

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	<b>Características agronômicas da espécie</b> .....	16
2.2	<b>Atividade biológica e usos da <i>Urtica dioica</i></b> .....	18
2.3	<b>Cultura de tecidos de plantas medicinais</b> .....	19
2.4	<b>Sistema de ventilação natural</b> .....	21
2.5	<b>Luz no cultivo das plantas medicinais</b> .....	22
2.6	<b>Metabólitos secundários e atividade antioxidante</b> .....	23
3	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
	<b>CAPÍTULO 2 QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ AFETAM O CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Urtica dioica</i> L. MICROPROPAGADAS</b> .....	38
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	40
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
2.1	<b>Estabelecimento <i>in vitro</i></b> .....	42
2.2	<b>Influência da qualidade da luz</b> .....	42
2.3	<b>Influência da intensidade de luz</b> .....	44
2.4	<b>Condições gerais dos experimentos</b> .....	44
2.4.1	<b>Análise do crescimento</b> .....	44
2.4.2	<b>Análise de pigmentos fotossintéticos</b> .....	45
2.4.3	<b>Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes</b> .....	45
2.4.3.1	<b>Preparação extrativa e condições gerais</b> .....	45
2.4.3.2	<b>Fenóis Totais</b> .....	46
2.4.3.3	<b>Flavonas/Flavonóis Totais</b> .....	46
2.4.3.4	<b>Capacidade Antioxidante Total (CAT)</b> .....	47
2.4.3.5	<b>Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)</b> .....	47
2.4.3.6	<b>Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)</b> .....	48
2.5	<b>Análises estatísticas</b> .....	48
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
3.1	<b>Qualidade de luz</b> .....	49
3.1.1	<b>Análise do crescimento</b> .....	49
3.1.2	<b>Análise de pigmentos fotossintéticos</b> .....	52
3.1.3	<b>Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes</b> .....	53
3.2	<b>Intensidade de luz</b> .....	54
3.2.1	<b>Análise do crescimento</b> .....	55
3.2.2	<b>Análise de Pigmentos Fotossintéticos</b> .....	57
3.2.3	<b>Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes</b> .....	58
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
	<b>CAPÍTULO 3 CRESCIMENTO <i>In vitro</i> E ACÚMULO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE <i>Urtica dioica</i> L. MICROPROPAGADAS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE VENTILAÇÃO NATURAL</b> .....	68
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	70
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	72

2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	72
2.2	Sistema de Ventilação Natural.....	72
2.3	Análises do crescimento.....	74
2.4	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	74
2.5	Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes.....	75
2.5.1	Preparação extrativa e condições gerais.....	75
2.5.2	Fenóis Totais.....	75
2.5.3	Flavonas/Flavonóis Totais.....	76
2.5.4	Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	76
2.5.5	Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH).....	76
2.5.6	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	77
2.6	Análises estatísticas.....	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.1	Crescimento <i>in vitro</i> .....	79
3.2	Pigmentos fotossintéticos.....	81
3.3	Compostos fenólicos e atividades antioxidantes.....	85
4	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm um papel de suma importância para a população de baixa renda. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais no tratamento de enfermidades (WHO, 2011). Entretanto, seu uso tradicional é fundamentado no saber popular passado de geração a geração, sem fundamentação científica (IANCK et al., 2017; OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012; SILVA, 2014).

O mercado mundial de fitoterápicos movimentou 71,19 bilhões de dólares em 2016 e espera-se um crescimento econômico desse setor (HEXA RESEARCH, 2017). Com o avanço da indústria farmacêutica, o estudo do metabolismo secundário das plantas medicinais possibilita abrir novos horizontes para a criação de novos medicamentos (MORAIS et al., 2012), visto que existe um vasto número de compostos fitoquímicos presentes nas plantas que ainda não foram estudados (SHAKIYA, 2016).

Pertencente a família Urticaceae, a *Urtica dioica* L., conhecida popularmente no Brasil como “urtiga”, é uma planta rica em vitaminas, ferro, cálcio, sódio e ácidos graxos (RUTTO et al., 2013). É explorada pela indústria têxtil, alimentícia e pela medicina popular no tratamento de artrite, reumatismo, paralisia muscular e diabetes mellitus (UPTON, 2013). Ultimamente, a espécie tem chamado a atenção dos pesquisadores por apresentar evidências de atividade anticancerígena (FATTAHI et al., 2018; MOHAMMADI et al., 2016).

Para a produção de mudas *in vivo* da espécie é necessário um grande espaço (DI VIRGILIO et al., 2015). A micropropagação assim se apresenta como uma ferramenta para a propagação vegetativa de matrizes com características genéticas superiores, em menor espaço, alta escala e durante o ano todo, assim como permite estudar a influência do ambiente no crescimento e no metabolismo secundário da espécie (AMARAL-BAROLI et al., 2016; GONÇALVES; ROMANO, 2013). Na micropropagação, a qualidade e a intensidade da luz são fatores ambientais que devem ser controlados, pois afetam a fotossíntese, a fotomorfogênese e o metabolismo secundário das plantas (LAZZARINI et al., 2018; SILVA et al., 2017).

No cultivo *in vitro*, o microclima criado dentro do recipiente pode levar a desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, como raízes malformadas, baixa concentração de clorofilas, reduzida sobrevivência na fase de aclimatização e hiper-hidricidade (ISAH, 2015).

O uso do sistema de ventilação natural permite superar esses problemas do cultivo *in vitro*, uma vez que promove trocas gasosas com o ambiente externo, mantendo concentrações ideais de CO<sub>2</sub>, favorecendo a abertura estomática e maior taxa fotossintética, condições que afetam, inclusive, o metabolismo secundário das plântulas *in vitro* (SALDANHA et al., 2012; SILVA et al., 2017).

Um protocolo de micropropagação eficiente é específico para cada espécie. Portanto, a avaliação de parâmetros que influenciam na sua organogênese, como a luz e CO<sub>2</sub> disponível para as plântulas, visando às melhores condições para expressão da totipotência das células vegetais, deve ser estudada. Além disso, esses parâmetros fazem com que a planta produza diferentes compostos e quantidades distintas de metabólitos secundários de interesse (ALVARENGA et al., 2015; NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

Na literatura, existe uma carência de informações sobre as condições ambientais favoráveis à micropropagação da espécie e quanto à quantificação dos metabólitos secundários da espécie cultivada *in vitro*. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da intensidade, qualidade da luz e uso do sistema de ventilação natural no crescimento e acúmulo de pigmentos fotossintetizantes e de compostos com atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* micropropagadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características agronômicas da espécie

A família Urticaceae compreende aproximadamente 53 gêneros e 2655 espécies (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016), tendo ampla distribuição em regiões tropicais e temperadas ao redor do mundo (WU et al., 2013). No Brasil, existem 13 gêneros, como *Laportea*, *Urera*, *Phenax* e *Urtica*, sendo 109 espécies com diferentes hábitos, desde ervas perenes a árvores encontradas em todos os estados brasileiros. O gênero *Urtica* possui 4 espécies, sendo elas *Urtica circularis* (Hicken) Sorarú, *Urtica spathulata* Sm., *Urtica urens* L. e *Urtica dioica* L. (ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI, 2015).

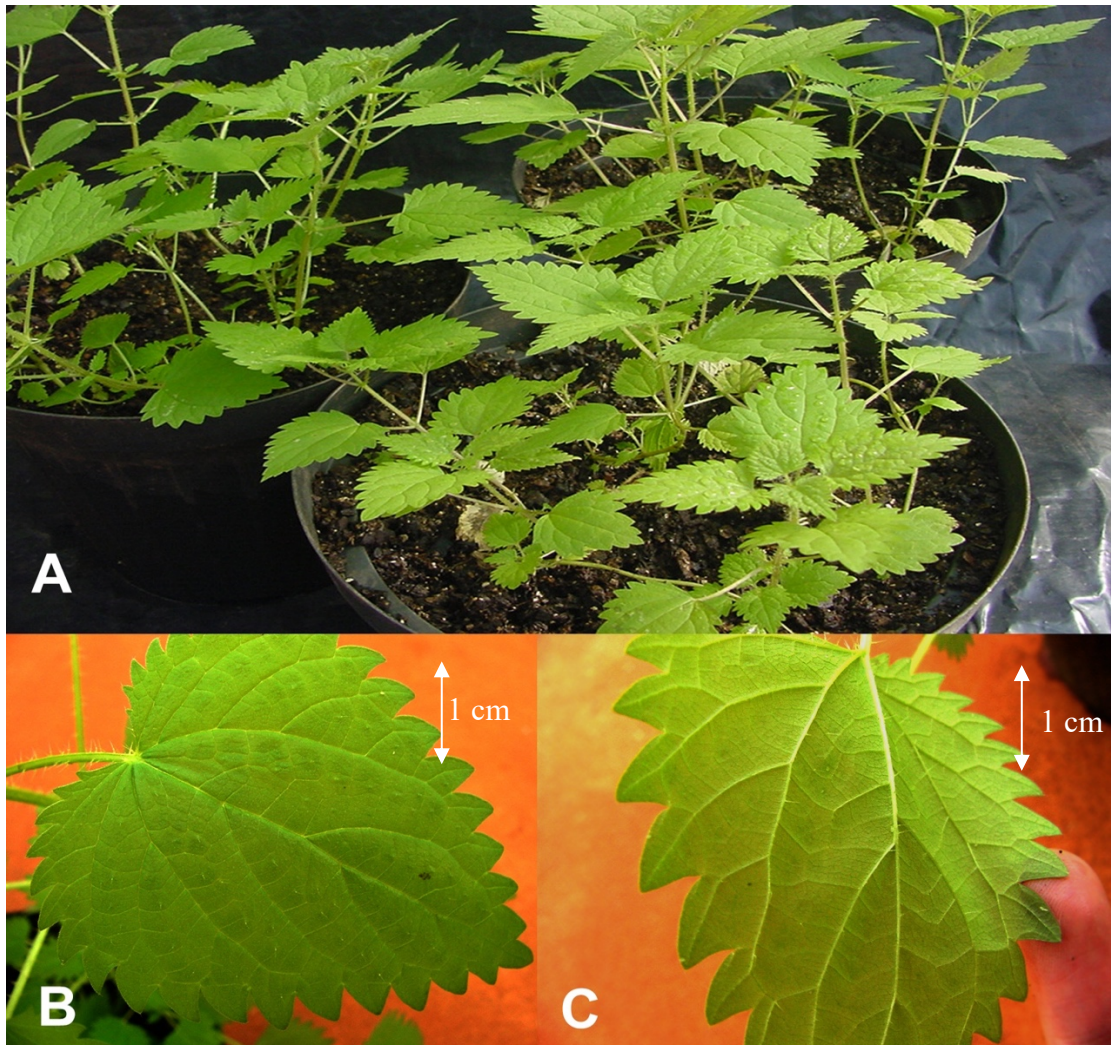
A espécie *Urtica dioica* L. (FIGURA 1), popularmente conhecida como “urtiga”, é nativa da Ásia, Europa, norte da África e América do Norte (TAYLOR, 2009). Considerada uma planta invasora de áreas cultivadas (TAYLOR, 2009), a *U. dioica* é capaz de causar reações alérgicas e dor ao entrar em contato com a pele (ADHIKARI; BAJRACHARYA; SHRESTHA, 2016; LIMA et al., 2008). Em decorrência de seus tricomas urticantes, a espécie não é comumente cultivada para alimentação, apesar de bastante utilizada como alimento em países em desenvolvimento (UPRETY et al., 2012).

A urtiga é uma espécie herbácea perene, podendo ser encontrada em forma de subarbusto de até 2 m de altura (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016). Seu caule é simples, de coloração esverdeada e apresenta poucas ramificações. Suas folhas podem ser ovais ou lanceoladas e opostas, com caules e folhas cobertos por tricomas (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012; TAYLOR, 2009). Apresenta inflorescências em panículas com 2 a 8 cm. Suas flores são esverdeadas e unissexuais (UPTON, 2013). Os frutos são do tipo aquênio, com somente uma semente, medindo de 1 a 1,5 mm de comprimento e 0,7 a 0,9 mm em largura (REAUME, 2010).

A urtiga se desenvolve melhor em solos ricos em nitrogênio, fosfato e matéria orgânica (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012), com pH de 5,6 a 7,6 (DI VIRGILIO et al., 2015). Naturalmente propagada por rizomas e por sementes (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016), a urtiga é uma espécie anemocórica e é dificilmente polinizada por insetos (TAYLOR, 2009).



Figura 1 - A espécie *Urtica dioica* L. (Urticaceae), cultivada em vasos na casa-de vegetação; B – Face adaxial da folha; C – Face abaxial da folha.



Fonte: José Eduardo B. P. Pinto (2018).

Em razão do alto nível de heterozigose, a propagação seminífera resulta em plantas não homogêneas (VOGL; HARTL, 2003). Sendo assim, para a produção comercial da espécie, visando a produção uniforme de clones de alto teor de fibras e matéria-prima para produção de fitoterápicos, a propagação vegetativa se apresenta como potencial ferramenta para o cultivo de mudas da espécie, via estaquia (VOGL; HARTL, 2003) ou rizomas (JANKAUSKIENE; GRUZDEVIEŃÉ, 2013; WURL et al., 2002), os quais devem ser dispostos de 5 a 8 cm de profundidade, com espaçamento de 40 a 60 cm entre plantas e de 75 cm a 1 m entre linhas (JANKAUSKIENE; GRUZDEVIEŃÉ, 2013).

Quando se objetiva a produção de folhas, a colheita deve ser realizada no outono. Entretanto, se o foco é a produção de matéria-prima para a indústria têxtil, é indicado realizar a colheita no verão, período em que a qualidade das fibras do caule é maior (DI VIRGILIO et al., 2015).

## 2.2 Atividade biológica e usos da *Urtica dioica*

As folhas da urtiga são a principal fonte dos compostos bioativos da espécie, sendo utilizadas como matéria-prima na produção de extratos utilizados, na medicina popular, há centenas de anos (DI VIRGILIO et al., 2015). Suas folhas, flores e caule são utilizados na forma de infusão e decocção para o tratamento de artrite, anemia, reumatismo, paralisia muscular, diabetes, hiperplasia prostática benigna e úlcera. A espécie é empregada há séculos na “urticação”, tratamento utilizado para estimular a circulação sanguínea (UPTON, 2013). Existem relatos do uso da urtiga, desde o Egito antigo, pela infusão da planta para tratamento da artrite (HARRISON, 1966).

A *Urtica dioica* contém vitamina A, C, cálcio, ferro, sódio e ácidos graxos (RUTTO et al., 2013). No setor alimentício, seu extrato pode ser utilizado para a produção de alimentos funcionais com maior teor de antioxidantes (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015) e pode ser utilizado como ingrediente na fabricação de queijos, atuando na coagulação do leite e melhorando as propriedades organolépticas (FIOL et al., 2016). Na piscicultura, é estudada por apresentar atividade imunostimulante e promotora de crescimento em peixes (DE VICO; GUIDA; CARELLA, 2018; VAN HAI, 2015). Na avicultura, estudos demonstram que o uso do extrato etanólico da *U. dioica* na alimentação das aves promove o aumento da resistência a doenças (ŞANDRU et al., 2016). A espécie tem sido explorada pela indústria têxtil na produção sustentável de fibras para a produção de cordas, tecidos e redes de pesca (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012). Existem, inclusive, programas de melhoramento e seleção de clones de alto rendimento de fibra na Europa (DI VIRGILIO et al., 2015).

Por ser uma espécie que utiliza bastante nitrogênio do solo, a urtiga pode ser utilizada na fitorremediação do solo, prevenindo que o nitrogênio chegue até os corpos d'água e cause eutrofização (VIKTOROVA et al., 2016). Pode ser utilizada como planta de cobertura e indicada como abrigo para inimigos naturais (DI VIRGILIO et al., 2015).

Pesquisas recentes relatam a importância da espécie no setor farmacêutico. A utilização de extrato hidroalcolico da *Urtica dioica* atenuou, significativamente, a hiperglicemia em ratos (SHOKRZADEH et al., 2018) e reduziu os fatores de risco de incidência cardiovascular em pacientes com diabetes mellitus (AMIRI BEHZADI; KALALIAN-MOGHADDAM; AHMADI, 2016). Liao et al. (2016), ao estudarem a eficácia do gel obtido do extrato metanólico das raízes da urtiga no tratamento de artrite reumatoide em ratos, indicam a urtiga como um potencial ingrediente na fabricação de medicamentos para o tratamento da doença, em razão de sua atividade analgésica e anti-inflamatória. O uso

da urtiga pode ser combinado com o uso de anti-inflamatórios. Chrubasik et al. (1997) reportaram que 50 mg de *U. dioica* associado a 50 mg de diclofenaco, possui a mesma resposta anti-inflamatória que uma dose de 200 mg do medicamento alopático isolado.

A sensação de irritação ao ser tocada é causada, em razão da presença de ácido fórmico, histamina, serotonina e acetilcolina em seus tricomas (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012). Estudos relatam a presença de saponinas, flavonoides, esteróis, taninos, ácidos graxos, clorofilas, carotenoides, proteínas e vitaminas em plantas de *Urtica dioica* (GÜL et al., 2012; RAFAJLOVSKA et al., 2013).

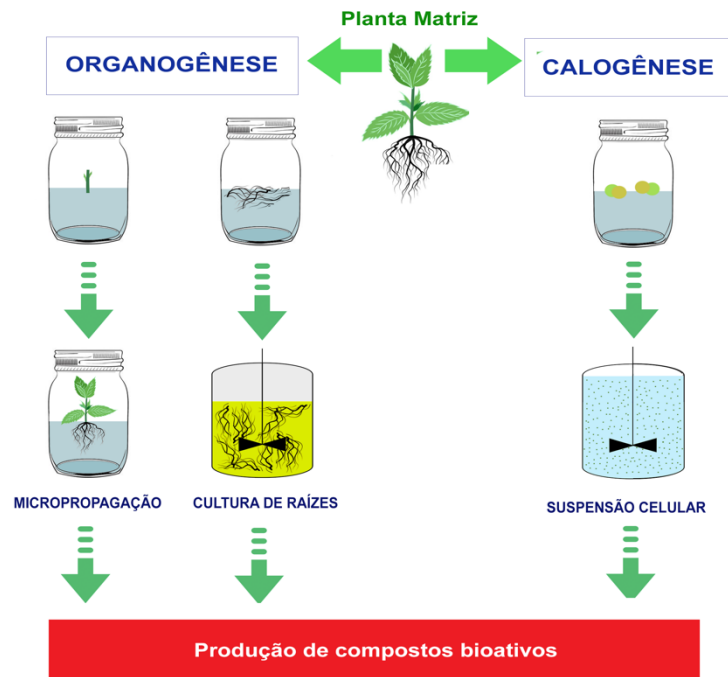
A espécie tem recebido atenção especial dos pesquisadores por apresentar evidências de atividade anticancerígena (ADHIKARI; BAJRACHARYA; SHRESTHA, 2016; FATTAHI et al., 2018; MOHAMMADI et al., 2016). Nas últimas décadas, houve um aumento expressivo no consumo de plantas medicinais empregadas na prevenção de doenças crônicas, cardiovasculares e certos tipos de câncer, decorrentes das ações dos compostos bioativos produzidos durante o metabolismo secundário, como os compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides (DOU et al., 2017). A cultura de tecidos de plantas medicinais permite o estudo da influência do ambiente no acúmulo desses compostos, assim como a produção de mudas de qualidade em larga escala.

### 2.3 Cultura de tecidos de plantas medicinais

A cultura de tecidos vegetais permite a produção de plântulas *in vitro* a partir de células, órgãos e tecidos vegetais, sendo aplicada na pesquisa e produção de plantas livres de doenças, na obtenção de mudas de espécies de difícil propagação, na transformação genética e na produção de metabólitos secundários de valor comercial (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; ALTPETER et al., 2016). Na cultura de tecidos, existem duas vias para produção de compostos bioativos: a *calogênese*, utilizada na biotecnologia na transformação genética de plantas e cultura de suspensão celular, e a *organogênese*, via cultura de raízes e micropropagação (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018) (FIGURA 2).

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais, que permite a produção de mudas livres de patógenos, em alta escala, sob condições ambientais controladas e durante todo o ano. Visa a obter plantas com maior produção de biomassa, rendimento e composição uniforme dos metabólitos secundários de interesse (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; KARUPPUSAMY, 2009).

Figura 2 - Métodos para a produção de compostos bioativos com uso da cultura de tecidos.



Fonte: Adaptado de Espinosa-Leal, Puente-Garza e García-Lara (2018).

Apesar das vantagens da micropropagação das plantas medicinais, um protocolo de micropropagação eficiente é específico para cada espécie, em razão de diferentes respostas fisiológicas e morfológicas das plantas à organogênese (ISAH, 2015). Estudos recentes reportam sobre a micropropagação de espécies medicinais: estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae) (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2017), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae) (FERNANDES et al., 2013), agave (*Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dick, Asparagaceae) (PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017), mil-folhas (*Achillea millefolium* L., Asteraceae) (ALVARENGA et al., 2015), orquídea (*Cattleya walkeriana* Gardner, Orchidaceae) (SILVA et al., 2014), hortelã-da-folha-grossa (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Lamiaceae) (SILVA et al., 2017), erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae) (CARVALHO et al., 2018) e alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae) (LAZZARINI et al., 2018; LAZZARINI et al., 2019).

Pela técnica de micropropagação, é possível estudar a influência do ambiente no crescimento, desenvolvimento e no metabolismo secundário das plantas medicinais, controlando o microclima dentro do tubo de ensaio e observando as respostas morfofisiológicas das plantas (DOU et al., 2017; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2017). A biossíntese de metabólitos secundários, como

os compostos fenólicos e flavonoides, depende de condições intrínsecas à espécie, como seu código genético, sendo a resposta fisiológica ao ambiente dependente de cada espécie (LI et al., 2014; PEDROSO et al., 2017; TAULAVUORI et al., 2018).

Na micropropagação, plântulas necessitam de fontes externas de carbono, como sacarose, uma vez que há pouco CO<sub>2</sub> disponível para uma fotossíntese eficiente (KOZAI, 2010), sendo a resposta variável de acordo com a espécie. Entretanto, a redução da sacarose no meio de cultura reduz custos, diminui a proliferação de fungos e bactérias no meio de cultura (XIAO; KOZAI, 2006), influencia no crescimento (JO et al., 2009) e pode aumentar as trocas gasosas com o exterior, em caso do uso de sistemas que permitem tais trocas gasosas (IAREMA et al., 2012).

No sistema de cultivo *in vitro* convencional, os recipientes devem apresentar um microambiente isento de contaminação por microorganismos. Nesse sistema, os recipientes são vedados impedindo o contato com o exterior, expondo a plântula a um microambiente com baixa luminosidade, baixa concentração de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa, alta concentração de etileno e sem trocas gasosas com o ambiente externo (KOZAI; KUBOTA, 2001). Essas condições são propícias para o aparecimento de anomalias, como a baixa concentração de clorofilas, hiperhidricidade e raízes malformadas, gerando grandes perdas na fase de aclimatização e mau funcionamento dos estômatos (ISAH, 2015).

#### **2.4 Sistema de ventilação natural**

O sistema de ventilação natural permite trocas gasosas do recipiente com o exterior, ao mesmo tempo em que mantém um microambiente asséptico. Dessa forma, há um aumento da aeração, redução da umidade relativa, maior sobrevivência na fase de aclimatização e maior produção de fotoassimilados, uma vez que mantém a concentração ideal de CO<sub>2</sub> e melhora a capacidade fotossintética (MOREIRA et al., 2013; SALDANHA et al., 2012).

Entretanto, membranas comerciais para a montagem do sistema de ventilação natural possuem alto custo de mercado. Saldanha et al. (2012) criaram uma membrana de qualidade com materiais de baixo custo, utilizada em pesquisas recentes no estudo da influência do sistema de cultivo no crescimento e no metabolismo secundário.

Pesquisas reportam que o uso das membranas aumenta as trocas gasosas, influenciam o crescimento e o metabolismo secundário de plantas medicinais cultivadas *in vitro*. Iarema et al. (2012), avaliaram plântulas de ginseng-brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, família Amaranthaceae) cultivadas sob sistema convencional e sistema de ventilação natural

com 1 e 2 membranas, observando maior crescimento e aumento do acúmulo de 20-hidroxiecdisona quando seu cultivo é associado à ausência de sacarose no meio de cultura. Silva et al. (2017), observaram que o uso do sistema de ventilação natural com 1 e 2 membranas aumenta a matéria seca de *Plectranthus amboinicus*, ao passo que o uso de 4 membranas aumenta o acúmulo de carvacrol.

## 2.5 Luz no cultivo das plantas medicinais

A luz é considerada um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta, assim como influencia fortemente o metabolismo secundário (DOU et al., 2017). Segundo Kozai et al. (2015), o custo com eletricidade é um dos mais altos na produção comercial em cultivo protegido, onde as lâmpadas fluorescentes branca-fria são as mais utilizadas. Houve um aumento no interesse na substituição dessas lâmpadas por diodos emissores de luz (LED), em razão do baixo custo de instalação, longevidade e capacidade de emitir um comprimento de onda específico para as plantas (LAZZARINI et al., 2017; MITCHEL, 2015; STUTTE, 2015). Além disso, lâmpadas fluorescentes emitem o comprimento de onda de 350 a 750 nm, contendo uma faixa de espectro de luz desnecessária para a fotossíntese e crescimento das plantas (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2017), uma vez que as plantas utilizam somente o espectro de luz de 400-700 nm, conhecido como radiação fotossinteticamente ativa (TAIZ et al., 2017).

A luz vermelha monocromática estimula a fotossíntese, em decorrência do comprimento de onda do vermelho (660 nm) ser correspondente ao pico de absorção dos fitocromos (DOU et al., 2017; TAIZ et al., 2017). O uso da luz vermelha promove o alongamento do hipocótilo, decorrente de uma condição conhecida por “fitocromo-dependente” (DARKO et al., 2014) e também ativa os genes responsáveis pela biossíntese de giberelinas (KAMIYA; GARCIA-MARTINEZ, 1999).

Luz azul monocromática (470 nm) promove a abertura estomática (TAIZ et al., 2017). Por ser bastante energética, é considerada um ativador efetivo para o acúmulo de carotenoides nas plantas, onde a resposta fisiológica é dependente da espécie (ZHANG et al., 2015). Johkan et al. (2010), ao estudarem o efeito do uso de LEDs no crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L., Asteraceae), demonstraram a importância da qualidade da luz azul no aumento da concentração de carotenoides e melhores resultados na aclimatização, uma vez que estavam mais preparadas para lidar com o estresse luminoso.

Os comprimentos de onda do azul e vermelho e suas combinações, estão associados com o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de fitohormônios (OUYANG et al., 2015). A taxa fotossintética e produtividade das plantas aumentam sob combinações de luz azul e vermelha, mas diminuem com o aumento da proporção da luz azul (BUGBEE, 2016). Pesquisas recentes têm comprovado a eficácia da luz vermelha suplementada com luz azul, no crescimento de plantas medicinais (DOU et al., 2017). De acordo com Sabzalian et al. (2014), o comprimento de onda fornecido às plantas pela combinação da luz azul e vermelha promove uma maior excitação dos fitocromos, criptocromos e fototropinas, levando a melhores resultados de crescimento.

Além da qualidade da luz, a intensidade da luz também exerce influência no metabolismo vegetal. Sob baixa luminosidade, as plantas não produzem fotoassimilados de maneira eficaz, ao passo que sob estresse luminoso sofrem danos, em razão da foto-oxidação (TAIZ et al., 2017). Silva et al. (2017), observaram que a intensidade da luz de  $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi benéfica para o crescimento *in vitro* de *Plectranthus amboinicus*, assim como influenciaram o conteúdo de carvacrol encontrado na fração volátil das plântulas da espécie. Karimi et al. (2013), ao avaliarem plantas de *Labisia pumila* (Primulaceae) cultivadas sob duas intensidades de luz em casa-de-vegetação ( $310$  e  $630 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concluíram que maiores irradiâncias aumentam a concentração de compostos fenólicos totais nas plantas.

Produtores de plantas medicinais têm optado pela produção em casas-de-vegetação (DOU et al., 2017). Assim, estudando a resposta das plantas à luz é possível entender a fisiologia vegetal e manipular o ambiente, para otimizar o acúmulo de compostos fitoquímicos de interesse nas plantas medicinais, possibilitando a produção de matéria-prima de qualidade (JAAFAR; HARIS; RAHMAT, 2008). Entretanto, o conhecimento sobre a influência da qualidade e intensidade de luz no crescimento e no metabolismo secundário das plantas ainda está limitado, necessitando de estudos mais aprofundados e com diferentes espécies (HERNANDEZ; KUBOTA, 2016).

## **2.6 Metabólitos secundários e atividade antioxidante**

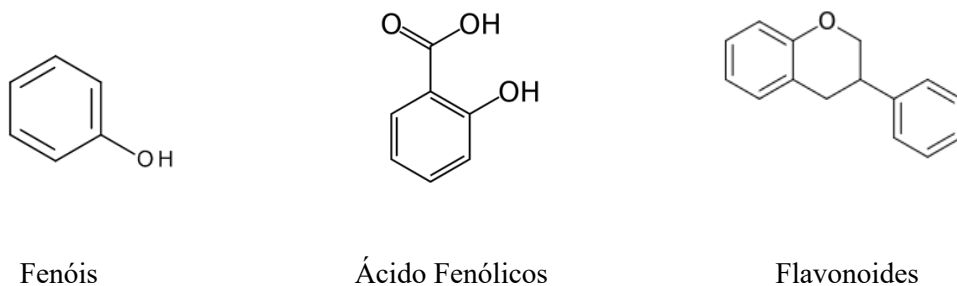
No metabolismo primário, as plantas produzem macromoléculas essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento, como os açúcares, ácidos graxos e proteínas, ao passo que os metabólitos secundários são micromoléculas de grande variação estrutural, produzidas em respostas às alterações ambientais, com o objetivo de adaptação e sobrevivência, sendo

espécie-específicas (TAIZ et al., 2017). São divididos em 3 grandes grupos: terpenos e esteroides, alcaloides e compostos fenólicos (AHMED; ARSHAD; KHAN, 2017).

Muitos destes compostos bioativos, como os compostos fenólicos, são utilizados como matéria-prima para a produção de novos medicamentos fitoterápicos, decorrente da sua atividade biológica, anti-inflamatória, antibiótica e antioxidante, sendo também de grande importância na indústria de alimentos (ČANADANOVIĆ-BRUNET et al., 2009).

Os compostos fenólicos são compostos por fenóis, ácidos fenólicos e flavonoides (FIGURA 3) (AHMED; ARSHAD; KHAN, 2017), com um papel associado à adaptação ao ambiente e resistência a patógenos e predadores (LI et al., 2014). São produzidos pela via biossintética mista do ácido chiquímico e ácido acético. A via do chiquimato tem início na condensação de moléculas de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato, formando o ácido chiquímico e, posteriormente, a formação do ácido corísmico. Após uma série de estágios intermediários, as moléculas de fenilalanina são formadas. A fenilalanina é utilizada na rota biossintética dos fenilpropanóides, onde é transformada em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Posteriormente, após diferentes reações químicas, são formados diversos fenilpropanoides, apresentando blocos de construção C6C3, dando origem a vários metabólitos secundários, como os flavonoides (KOUGAN et al., 2013) (FIGURA 4).

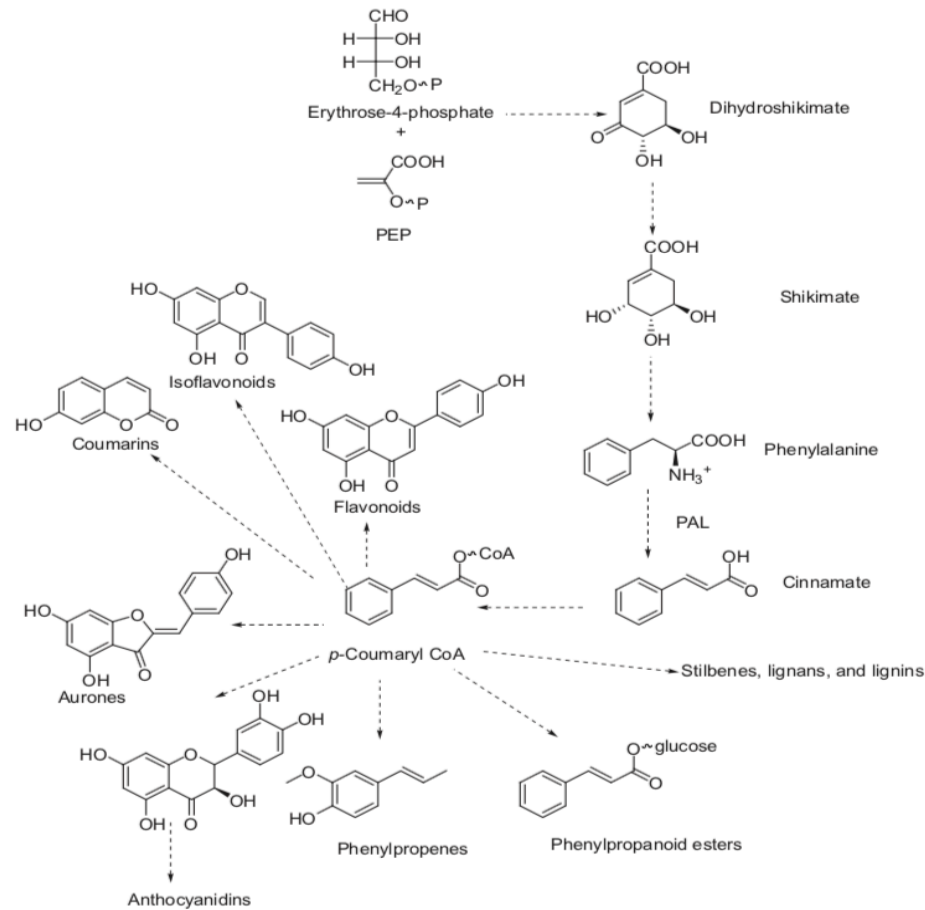
Figura 3 - Estruturas químicas básicas dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Ahmed, Arshad e Khan (2017).



Figura 4 - Rota biossintética de alguns compostos fenólicos pela via do chiquimato.



Fonte: Kougan et al. (2013).

Os flavonoides possuem esqueletos de carbono na forma C6-C3-C6, e são produtos do metabolismo secundário das plantas por via mista de biossíntese: via ácido chiquímico (a partir da fenilalanina) e ácido acético (via moléculas de acetil-CoA) (SIMÕES, 2001). São encontrados na epiderme das folhas e nas frutas. São utilizados pelas plantas para proteção contra a radiação ultravioleta, pigmentação, como antioxidante e contra o ataque de insetos e patógenos (AHMED; ARSHAD; KHAN, 2017).

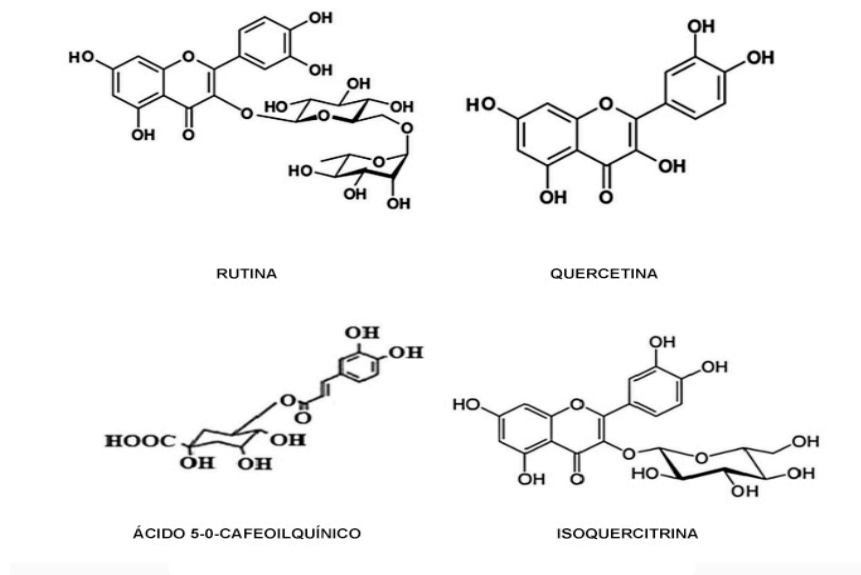
Os principais compostos bioativos presentes na urtiga são: quercetina, rutina, isoquercitrina e o ácido 5-O-cafeoilquínico (FIGURA 5) (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016; ORČIĆ et al., 2014). Segundo Jan, Zarafshan e Singh (2016), os compostos fenólicos são os responsáveis pela atividade terapêutica da espécie.

Sarikurkcu et al. (2017), reportaram 16,6 mg de equivalente em ácido gálico por grama de planta ( $\text{mgEAG gplanta}^{-1}$ ) ao quantificar os compostos fenólicos totais do extrato etanólico de *Urtica dioica* selvagens na Turquia. Kukrić et al. (2012) reportaram um acúmulo

de 208,37 mgEAG gMS<sup>-1</sup> (matéria seca da planta) de compostos fenólicos totais e 20,29 mg de equivalente em quercetina por grama de matéria seca (mgEQ gMS<sup>-1</sup>) quanto aos flavonoides totais ao avaliar o extrato seco de plantas de *U. dioica* selvagens, coletadas na região da República Sérvia.

Os compostos fenólicos e flavonoides apresentam atividade antioxidante (AO et al., 2008; KARIMI et al., 2013). Quercetina e isoquercitrina apresentam atividade anti-inflamatória (ROGERIO et al., 2007).

Figura 5 - Compostos bioativos encontrados em maior quantidade na *Urtica dioica*.



Fonte: Jan, Zarafshan e Singh (2016).

Os compostos antioxidantes atuam no sequestro de radicais livres produzidos no metabolismo, como os íons superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e são empregados na prevenção de doenças ligadas ao estresse oxidativo (PISOSCHI; POP, 2015). Há um crescente número de pesquisas visando à produção de antioxidantes de fontes naturais, uma vez que não proporcionam efeitos nocivos à saúde, ao contrário dos antioxidantes sintéticos (XU et al., 2017; LI et al., 2014). Os antioxidantes naturais, encontrados nos vegetais, retardam o processo de muitas doenças crônicas, previnem o aparecimento do câncer e aumentam o tempo de prateleira de alimentos (OSKOUÉIAN et al., 2011), sendo de grande potencial para a aplicação industrial (YÁÑEZ et al., 2012).

É possível determinar a capacidade antioxidante dos extratos das plantas medicinais por meio dos métodos •DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil), Capacidade Antioxidante Total (CAT), Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC), dentre outros (OJHA et al.,

2018). O DPPH é um radical livre que possui um elétron desemparelhado em um dos seus átomos de Nitrogênio, apresentando cor púrpura. Ao entrar em contato com uma substância antioxidante, este elétron se emparelha com um elétron de um Hidrogênio, formando um complexo químico que apresenta cor amarelada (OLIVEIRA, 2015). A capacidade antioxidante total (CAT) é medida pelo teste do fosfomolibdênio, que tem como princípio básico a redução do  $\text{Mo}^{6+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$ , pelos compostos antioxidantes contidos nas plantas (KHAN et al., 2012), fazendo com que a solução fique esverdeada. O método da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) é baseado na oxidação da fluoresceína por radicais peroxila adicionado ao teste. Os antioxidantes presentes nas plantas protegem a fluoresceína, bloqueando a reação de oxidação (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). Todos os três métodos utilizam a leitura da absorbância via espectrofotômetro (OJHA et al., 2018).

Estudos reportam dados sobre a atividade antioxidante da urtiga. Kukrić et al. (2012) encontraram um  $\text{IC}_{50}$  de  $31,38 \mu\text{g mL}^{-1}$  no extrato seco de folhas de plantas selvagens da espécie, coletadas na região da República da Sérvia, considerando a espécie de fraca a moderada capacidade antioxidante. Entretanto, Güder e Korkmax (2012) relataram que extratos hidroalcoólicos de urtiga cultivadas no Irã apresentaram percentagem de inibição na peroxidação do ácido linoléico de 81,7% para sementes, 79,8% para raízes, 78,3% flores e 76,4% folhas, valores superiores aos dos padrões BHA (66,2%), BHT (70,6%) e  $\alpha$ -tocoferol (50,1%), indicando alta atividade antioxidante.

Condições ambientais, temperatura, disponibilidade hídrica, ritmo circadiano, idade da planta, sazonalidade, hora do dia, nutrientes disponíveis, luz, danos mecânicos e concentração de  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$  fazem com que a planta acumule diferentes compostos e quantidades distintas de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A *Urtica dioica* L., apesar de negligenciada é considerada uma espécie invasora de áreas cultivadas, é uma planta medicinal de aplicação no tratamento da artrite, hiperplasia prostática benigna e de potencial uso no tratamento da diabetes mellitus. A espécie é utilizada na indústria alimentícia, agropecuária e na produção sustentável de fibras para a indústria têxtil. A *U. dioica* também tem se destacado como aliada na prevenção do câncer, em razão de sua propriedade antioxidante. Entretanto, a espécie é pouco estudada do ponto de vista agrônomo.

Na literatura, existe uma carência de informações sobre a quantificação dos metabólitos secundários da espécie e as condições ambientais favoráveis para a micropropagação da *Urtica dioica*, seu crescimento *in vitro* e seus respectivos efeitos na biossíntese de compostos fenólicos e flavonoides.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, B. M.; BAJRACHARYA, A.; SHRESTHA, A. K. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 119-124, 2016.
- AHMED, S.; ARSHAD, M.; KHAN, M.Z. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacology and Phytochemistry**, v.6, n.2, p. 205-214, 2017.
- ALTPETER, F.; SPRINGER, N. M.; BARTLEY, L. E.; BLECHL, A.; BRUTNELL, T. P.; CITOVSKY, V.; LEMAUX, P. G. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **Plant Cell**, v. 28, n. 1, p. 1510-1520, 2016.
- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- AMARAL-BAROLI, A.; LAGO, J. H. G.; DE ALMEIDA, C. V.; DE ALMEIDA, M.; SCOTTI, M. T.; LEONE, G. F.; SARTORELLI, P. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (*in vitro*), acclimated (*ex vitro*) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 86, n. 1, p. 180-185, 2016.
- AMIRI BEHZADI, A.; KALALIAN-MOGHADDAM, H.; AHMADI, A. H. Effects of *Urtica dioica* supplementation on blood lipids, hepatic enzymes and nitric oxide levels in type 2 diabetic patients: A double blind, randomized clinical trial. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 686-695, 2016.
- AO, C.; LI, A.; ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 990-994, 2008.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; DURGO, K.; VOJVODIĆ, A.; BUŠIĆ, A. Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7723-7734, 2015.
- BISHT, S.; BHANDARI, S.; BISHT, N. S. *Urtica dioica* (L.): an undervalued, economically important plant. **Agriculture Science Research Journals**, v. 2, n. 5, p. 250-252, 2012.
- ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M.; ČETKOVIĆ, G. S.; DJILAS, S. M.; TUMBAS, V. T.; SAVATOVIĆ, S. S.; MANDIĆ, A. I.; CVETKOVIĆ, D. D. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. **International Journal Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 269-278, 2009.
- BUGBEE, B. In Toward an optimal spectral quality for plant growth and development: The importance of radiation capture. **In: VIII International Symposium on Light in Horticulture**, East Lansing, Michigan, USA, p. 1-12, 2016.

- CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Growth and volatiles in the micropropagation of Santa Maria herb. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 4, 2018.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M. ; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.
- CHRUBASIK, S.; ENDERLEIN, W.; BAUER, R.; GRABNER, W. Evidence for anti-rheumatic effectiveness of herba *Urtica dioica* in acute arthritis: a pilot study. **Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 105-108, 1997.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M. R. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130243, 2014.
- DE VICO, G.; GUIDA, V.; CARELLA, F. *Urtica dioica* (Stinging nettle): A neglected plant with emerging growth promoter/immunostimulant properties for farmed fish. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 285, p. 1-5, 2018.
- DI VIRGILIO, N.; PAPAZOGLU, E. G.; JANKAUSKIENE, Z.; DI LONARDO, S.; PRACZYK, M.; WIELGUSZ, K. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. **Industrial Crop and Products**, v. 68, n. 1, p. 42-49, 2015.
- DOU, H.; NIU, G.; GU, M.; MASABNI, J. Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. **Horticulturae**, v. 3, n. 36, p. 1-11, 2017.
- ESPINOSA-LEAL, C. A.; PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1-18, 2018.
- FATTAHI, S.; GHADAMI, E.; ASOURI, M.; MOTEVALIZADEH, A. A.; AKHAVAN-  
NIKI, H. *Urtica dioica* inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting Ornithine decarboxylase and Adenosine deaminase as key regulatory enzymes in adenosine and polyamines homeostasis in human breast cancer cell lines. **Cell Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 97-102, 2018.
- FERNANDES, V. F.; ALMEIDA, L. B. D.; FEIJÓ, E. V. D. S.; SILVA, D. D. C.; OLIVEIRA, R. A. D.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. D. B. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013.
- FIOL, C.; PRADO, D.; MORA, M.; ALAVA, J. I. Nettle cheese: Using nettle leaves (*Urtica dioica*) to coagulate milk in the fresh cheese making process. **International Journal of**

**Gastronomy and Food Science**, v. 4, n. 1, p. 19-24, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 166-174, 2013.

GÜDER, A.; KORKMAX, H. Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 913-923, 2012.

GÜL, S.; DEMIRCI, B.; BAŞER, K. H. C.; AKPULAT, H. A.; AKSU, P. Chemical composition and in-vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 666-671, 2012.

HARRISON, R.K. Healing Herbs of the Bible. **Leiden: EJ Brill Publishers**. 1966. 58p.

HERNANDEZ, R.; KUBOTA, C. Physiological responses of cucumber plantlets under different blue and red photon flux rations using LEDs. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, n. 1, p. 66-74, 2016.

HEXA RESEARCH. Herbal medicine market size and forecast, by product (tablets & capsules, powders, extracts), by indication (digestive disorders, respiratory disorders, blood disorders), and trend analysis (2014-2024). **Market Research Report**, 2017. 70 p.

IANCK, M. D. A.; MORAES, E. F. D.; MEZZOMO, T. R.; OLIVEIRA, V. B. D. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de unidades básicas de saúde na região de Colombo - PR. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 8, p. 29-30, 2017.

IAREMA, L.; DA CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Organ and Tissue Culture**, v. 110, n. 1, p. 227-238, 2012.

ISAH, T. Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 57, n. 2, p. 9-28, 2015.

RAHMAT, A.; JAAFAR, H. Z. E.; HARIS, N. B. M. Accumulation and partitioning of total phenols in two varieties of *Labisia pumila* Benth. under manipulation of greenhouse irradiance. **Acta Horticulturae**, v. 797, n. 1, p. 387-392, 2008.

JAN, K. N.; ZARAFSHAN, K.; SINGH, S. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potencial. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 2, p. 423-433, 2016.

JANKAUSKIENE, Z.; GRUZDEVIENE, E. Investigation of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) in Lithuania. **Sociālo Zinātņu Žurnāls**, v. 1, n. 2, p. 176-186, 2013.

- JO, E. A.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 1, p. 307-315, 2009.
- JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S. N.; YOSHIHARA, T. Blue light-emitting diode light irradiation of plantlets improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **Hortscience**, v. 45, n. 12, p. 1809-1814, 2010.
- KAMIYA, Y.; GARCIA-MARTINEZ, J. L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 5, p. 398-403, 1999.
- KARIMI, E.; JAAFAR, H. Z.; GHASEMZADEH, A.; IBRAHIM, M. H. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 7, p. 1016-1023, 2013.
- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.
- KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S.; AHMED, M. Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens*. **Chemical Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 43-54, 2012.
- KOUGAN, G. B.; TABOPDA, T.; KUETE, V.; VERPOORTE, R. Simple phenols, phenolic acids and related esters from the medicinal plants of Africa. **Medicinal Plants Research in Africa**, v. 1, n. 1, p. 225-249, 2013.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 1, p. 188-204, 2010.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001.
- KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. **Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production**. Academic Press, 2015.
- KUKRIĆ, Z. Z.; TOPALIĆ-TRIVUNOVIĆ, L. N.; KUKAVICA, B. M.; MATOŠ, S. B.; PAVIČIĆ, S. S.; BOROJA, M. M.; SAVIĆ, A. V. Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). **Acta Periodica Technologica**, v. 43, n. 1, p. 257-272, 2012.
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial crops and products**, v. 129, p. 35-44, 2019.
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 135, n.3, p. 367-379, 2018.



- LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Use of light-emitting diode (LED) in the physiology of cultivated plants – review. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p.137-144, 2017.
- LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, Y.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 6020-6047, 2014.
- LIAO, J. C.; WEI, Z. X.; MA, Z. P.; ZHAO, C.; CAI, D. Z. Evaluation of a root extract gel from *Urtica dioica* (Urticaceae) as analgesic and anti-inflammatory therapy in rheumatoid arthritis in mice. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 781-785, 2016.
- LIMA, N. G. P.; CABRAL, A. G.; FURTADO, F. F.; LIMA, I.; MACEDO, R. O. *Urtica dioica*: uma revisão dos estudos das suas propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 3, p. 199-206, 2008.
- MITCHEL, C.A. Academic research perspective of LEDs for the horticulture industry. **Hortscience**, v. 50, n. 1, p. 1293-1296, 2015.
- MOHAMMADI, A.; MANSOORI, B.; AGHAPOUR, M.; BARADARAN, B. *Urtica dioica* dichloromethane extract induce apoptosis from intrinsic pathway on human prostate cancer cells (PC3). **Cell Molecular Biology**, v. 62, n. 3, p. 78-83, 2016.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B. D.; SANTOS, A.; REIS, C. O. D.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.
- NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. In: **Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives**, InTech, 2016.
- OJHA, K.; DUBEY, S.; CHANDRAKAR, J.; MINJ, R.A.; DEHARIYA, R.; DIXIT, A.K. A review on different methods of determination of antioxidant activity assay of herbal plants. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 707-731, 2018.
- OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

- ORČIĆ, D.; FRANCIŠKOVIĆ, M.; BEKVALAC, K.; SVIRČEV, E.; BEARA, I.; LESJAK, M.; MIMICA-DUKIĆ, N. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 48-53, 2014.
- OSKOUÉIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; SAAD, W. Z.; OMAR, A. R.; HO, Y. W. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. kernel meal extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5955-5970, 2011.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.
- OUYANG, F.; MAO, J. F.; WANG, J.; ZHANG, S.; LI, Y. Transcriptome analysis reveals that red and blue light regulate growth and phytohormone metabolism in norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8: e0127896, 2015.
- PEDROSO, R. C. N.; BRANQUINHO, N. A. A.; HARA, A. C.; COSTA, A. C.; SILVA, F. G.; PIMENTA, L. P.; JANUARIO, A. H. Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marrubioides* plantlets cultivated *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 466-470, 2017.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 55-74, 2015.
- PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. **Industrial Crops and Products**, v. 105, n. 1, p. 225-230, 2017.
- RAFAJLOVSKA, V.; KAVRAKOVSKI, Z.; SIMONOVSKA, J.; SRBINOSKA, M. Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. **Quality of Life**, v. 4, n. 1, p. 26-30, 2013.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BAUTISTA-AGUILAR, J. R. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2017.
- REAUME, T. Stinging Nettle *Urtica dioica*, Urticaceae Nettle Family. **Nature Manitoba Grant**, 2010. Disponível em:  
<<http://www.naturemanitoba.ca/sites/default/files/StingingNettle.pdf>> Acesso em 21/10/2018.
- ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; DA SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 402-408, 2007.
- ROMANIUC-NETO, S.; GAGLIOTI, A.L. Urticaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil: Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.
- RUTTO, L. K.; XU, Y.; RAMIREZ, E.; BRANDT, M. Mineral Properties and Dietary Value

of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.), **International Journal of Food Science**, v. 2013, artigo ID 857120, p. 1-9, 2013.

SABZALIAN, M. R.; HEYDARIZADEH, P.; ZAHEDI, M.; BORROOMAND, A.; AGHAROKH, M.; SAHBA, M. R.; SCHOEFS, B. High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 1, p. 879-886, 2014.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; DE AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; DO RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. Low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

ŞANDRU, C. D.; NICULAE, M.; POPESCU, S.; PAŞTIU, A. I.; PÁLL, E.; SPINU, M. *Urtica dioica* alcoholic extract increases the cell-mediated innate immune potential in chickens. **Industrial Crops and Products**, v. 88, n. 1, p. 48-50, 2016.

SARIKURKCU, C.; TARGAN, S.; OZER, M. S.; TEPE, B. Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. 560-572, 2017.

SHAKIYA, A. K. Medicinal plants: a future source of drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SHOKRZADEH, M.; MIRSHAFI, A.; YEKTA MOGHADDAM, N.; BIRJANDIAN, B.; SHAKI, F. Mitochondrial dysfunction contribute to diabetic neurotoxicity induced by streptozocin in mice: protective effect of *Urtica dioica* and pioglitazone. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 18, n. 7, p. 499-506, 2018.

SILVA, S. Conhecimento e uso de plantas medicinais em uma comunidade rural no município de Cuitegi, Paraíba, Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 8, n. 1, p. 248-265, 2014.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. Crescimento *in vitro* e anatomia foliar de *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) cultivada em sistema de ventilação natural. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed.** UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2001. 1104p.

STUTTE, G.W. Commercial transition to LEDs: A pathway to high-value products. **HortScience**, v. 50, n. 1, p. 1297-1300, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal 6ª ed.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 858p.

- TAULAVUORI, K.; PYYSALO, A.; TAULAVUORI, E.; JULKUNEN-TIITTO, R. Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, n. 1, p. 183-187, June, 2018.
- TAYLOR, K. Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L., **Journal of Ecology**, v. 7, n. 1, p. 1436-1458, 2009.
- UPRETY, Y.; POUDEL, R. C.; SHRESTHA, K. K.; RAJBHANDARY, S.; TIWARI, N. N.; SHRESTHA, U. B.; ASSELIN, H. Diversity of use and local knowledge of wild edible plant resources in Nepal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2012.
- UPTON R. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): extraordinary vegetable medicine. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-38, 2013.
- VAN HAI, N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 446, n. 1, p. 88-96, 2015.
- VIKTOROVA, J.; JANDOVA, Z.; MADLENKOVA, M.; PROUZOVA, P.; BARTUNEK, V.; VRCHOTOVA, B.; MACEK, T. Native phytoremediation potential of *Urtica dioica* for removal of PCBs and heavy metals can be improved by genetic manipulations using constitutive CAMV 35S promoter. **PloS One**, v. 11, n. 12, e0167927, 2016.
- VOGL, C.R.; HARTL, A. Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: A review. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 18, n. 3, p. 119-128, 2003.
- WHO (World Health Organization). The World Traditional Medicines Situation. **Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges**, Geneva, v. 3, p. 1-14, 2011.
- WU, Z. Y.; MONRO, A. K.; MILNE, R. I.; WANG, H.; YI, T. S.; LIU, J.; LI, D. Z. Molecular phylogeny of the nettle family (Urticaceae) inferred from multiple loci of three genomes and extensive generic sampling. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 1, p. 814-827, 2013.
- WURL, G.; GRAFT, T.; VETTER, A.; BIERTUMFEL, A. 10 years agrotechnical trials to fibre nettle (*Urtica dioica* L.) in Thuringia. **Production, Processing and Use of Natural Fibres**, Potsdam-Bornim, v. 1, n.1, p. 95-96, 2002.
- XIAO, Y.; KOZAI, T. *In vitro* multiplication of statice plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 1, p. 71-77, 2006.
- XU, D.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J.; LI, H. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.
- YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; TAKEMOTO, J. K.; VEGA-VILLA, K. R.; ANDREWS, P. K.; SAYRE, C. L.; DAVIES, N. M. Polyphenols and Flavonoids: An Overview, in: **Flavonoid Pharmacokinetics - John Wiley & Sons, Inc.**, 2012. 69p.

ZHANG, L.; MA, G.; YAMAWAKI, K.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YOSHIOKA, T.; KATO, M. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, n. 1, p. 58-63, 2015.

## CAPÍTULO 2 QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ AFETAM O CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Urtica dioica* L. MICROPROPAGADAS

### RESUMO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae) é uma espécie de múltiplos usos, utilizada na indústria têxtil, farmacêutica e alimentícia. Conhecida como “urtiga” é popularmente indicada para o tratamento de diabetes, hiperplasia prostática benigna, artrite e reumatismo. Estudos das atividades biológicas da *U. dioica* indicam relação entre a sua composição fenólica e sua atividade antioxidante. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes qualidades e intensidades de luz no crescimento, acúmulo de compostos fenólicos e atividade antioxidante de plântulas de *U. dioica* micropropagadas. Dois experimentos foram realizados. No experimento de intensidade de luz, segmentos nodais foram cultivados sob as irradiâncias 26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtidas com lâmpadas LED. No experimento de qualidade de luz, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS sob lâmpadas LED azul, vermelho; 1vermelho:1azul; 2,5 vermelho:1 azul; 1 vermelho:2,5 azul; branco e sob lâmpada fluorescente branca fria. Aos 40 dias, foram avaliados os parâmetros biométricos, acúmulo de pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos e flavonoides totais e a capacidade antioxidante por diferentes mecanismos. No experimento de intensidade de luz, os melhores resultados de crescimentos foram observados nas plântulas sob 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Intensidades de luz a partir de 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favoreceram o enraizamento das plântulas e o aumento da área foliar. Plântulas sob 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  acumularam mais compostos fenólicos e flavonoides, assim como apresentaram maior atividade antioxidante em todos os mecanismos avaliados. No experimento de qualidade de luz, o uso do LED vermelho monocromático proporcionou o maior comprimento da parte aérea. O uso do LED azul, LED branco e lâmpada fluorescente branca fria beneficiaram a concentração de pigmentos fotossintéticos. A combinação dos LED 2,5 vermelho: 1 azul favoreceu a produção de matéria seca da espécie, ao passo que o uso do LED 1 vermelho:2,5 azul favoreceu o acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides, assim como a atividade antioxidante. A atividade antioxidante é diretamente influenciada pelo aumento da intensidade da luz. Os compostos fenólicos e flavonoides estão correlacionados com a atividade antioxidante da espécie. O aumento da proporção da luz vermelha induz o estiolamento da plântula.

**Palavras-chave:** Espectro. Irradiância. Antioxidante. Micropropagação.

## CHAPTER 2 QUALITY AND INTENSITY OF LIGHT AFFECT GROWTH AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MICROPROPAGATED *Urtica dioica* L.

### ABSTRACT

*Urtica dioica* L. (Urticaceae) is a species of multiple uses, used in the textile, pharmaceutical and food industries. Known as "stinging nettle", it is popularly indicated for the treatment of diabetes, benign prostatic hyperplasia, arthritis, and rheumatism. Studies of the biological activities of *U. dioica* indicate a relation between its phenolic composition and its antioxidant activity. The objective of this study was to evaluate the effect of different qualities and light intensities on growth, accumulation of phenolic compounds and antioxidant activity of micropropagated *U. dioica* plantlets. Two experiments were performed. In the light intensity experiment, nodal segments were grown under irradiations 26, 51, 69, 94, and 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtained with LED lamps. In the light quality experiment, nodal segments were grown in MS culture medium under LED lamps: red; blue; 1 red: 1blue; 2.5 red: 1 blue; 1 red: 2.5 blue; white, and under cold white fluorescent lamp. At 40 days, biometric parameters, accumulation of photosynthetic pigments, phenolic compounds and total flavonoids, and antioxidant capacity by different mechanisms were evaluated. In the light intensity experiment, the best growth results were observed in the seedlings under 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Light intensities from 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favored rooting and increased leaf area. Higher concentrations of photosynthetic pigments were observed at 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Plantlets under 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  accumulated more phenolic compounds and flavonoids, as well as presented higher antioxidant activity in all evaluated mechanisms. In the light quality experiment, the use of the monochromatic red LED provided the largest shoot length. The use of blue LED, white LED, and cold white fluorescent lamp favored the concentration of photosynthetic pigments. The combination of LEDs 2.5 red: 1 blue favored the dry matter production of the species, while the use of LED 1 red: 2.5 blue favored the accumulation of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity. The antioxidant activity is directly influenced by the increase in light intensity. The phenolic and flavonoid compounds are correlated with the antioxidant activity of the species. Increasing in red light proportion may induce etiolation.

**Keywords:** Spectrum. Irradiance. Antioxidant. Micropropagation. Stinging Nettle.

## 1 INTRODUÇÃO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae), apesar de considerada uma planta daninha, se destaca por suas propriedades nutricionais, medicinais e pela qualidade da sua fibra (LIMA et al., 2008; DI VIRGILIO et al., 2015; UPTON, 2013). Conhecida popularmente, no Brasil, como “urtiga”, na medicina popular, é utilizada no tratamento da artrite, reumatismo, paralisia muscular e diabetes mellitus (UPTON, 2013). Pesquisas recentes relatam a eficácia da espécie na indução de apoptose de células cancerígenas responsáveis pelo desenvolvimento do câncer de mama (FATTAHI et al., 2018) e de próstata (MOHAMMADI et al., 2016), associada ao poder antioxidante dos seus compostos fenólicos.

A micropropagação permite a produção sustentável de plantas geneticamente idênticas, em grande escala e livres de patógenos (SILVA et al., 2017). Essa técnica tem sido utilizada no estudo da influência do ambiente no crescimento e no metabolismo secundário das plântulas *in vitro*, assim como na obtenção de protocolos para otimizar a biossíntese de compostos fitoquímicos de interesse comercial (PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA; GUTIÉRREZ-URIBE, 2017; WITBOOI et al., 2017).

A qualidade e a intensidade da luz são dois parâmetros ambientais que afetam o crescimento, desenvolvimento e o metabolismo secundário das plantas. Entretanto, a resposta à luz é espécie-específica (TAIZ et al., 2017). Pesquisas recentes têm comprovado os efeitos da qualidade de luz no crescimento e no metabolismo secundário de plantas medicinais, como alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae) (LAZZARINI et al., 2018; LAZZARINI et al., 2019), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae) (FERNANDES et al., 2013), malvarisco (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Lamiaceae) (SILVA et al., 2017), erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae) (CARVALHO et al., 2018) e mil-folhas (*Achillea millefolium* L., Asteraceae) (ALVARENGA et al., 2015).

A intensidade luminosa é imprescindível para uma fotossíntese eficiente. Sob baixa luminosidade, as plantas não produzem fotoassimilados de maneira eficaz, ao passo que sob estresse luminoso sofrem danos, em decorrência da foto-oxidação (TAIZ et al., 2017). Contudo, a intensidade de luz também influencia a biossíntese de compostos antioxidantes. Pesquisas relatam a influência da intensidade de luz no crescimento, desenvolvimento e na biossíntese de metabólitos secundários de plantas medicinais *in vitro* (SILVA et al., 2017; CIOĆ et al., 2018).

Apesar de apresentar grande potencial medicinal e de grande importância para a indústria têxtil na produção de fibras a partir de fontes sustentáveis, não foram encontrados



relatos sobre a influência da luz na micropropagação da *Urtiga dioica*. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da intensidade e da qualidade de luz na micropropagação da espécie, assim como avaliar os efeitos no acúmulo de pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos, flavonoides totais, assim como avaliar o potencial antioxidante de plântulas de urtiga cultivadas *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais e no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG) na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais.

Explantos de uma planta-matriz de *Urtica dioica* L. (Urticaceae), pertencente ao Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foram coletados e encaminhados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais para estabelecimento *in vitro*. As exsiccatas foram depositadas no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG) em novembro de 2018, sob o registro 58577.

### 2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro* da espécie, os explantes foram desinfestados em água corrente com adição de detergente comercial, por 30 minutos, seguido de imersão em álcool 70%, por 30 segundos, e por posterior imersão em água sanitária com 1,25% de cloro ativo, por 15 minutos, sob agitação constante, seguidos de tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Em seguida, segmentos nodais e apicais foram padronizados em 1 cm com auxílio de um bisturi, e inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob lâmpada fluorescente branca fria (39 μmol<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) com temperatura de 26±1 °C e fotoperíodo de 16h. Os explantes foram repicados a cada 40 dias até a obtenção de material vegetal necessário para a montagem dos experimentos.

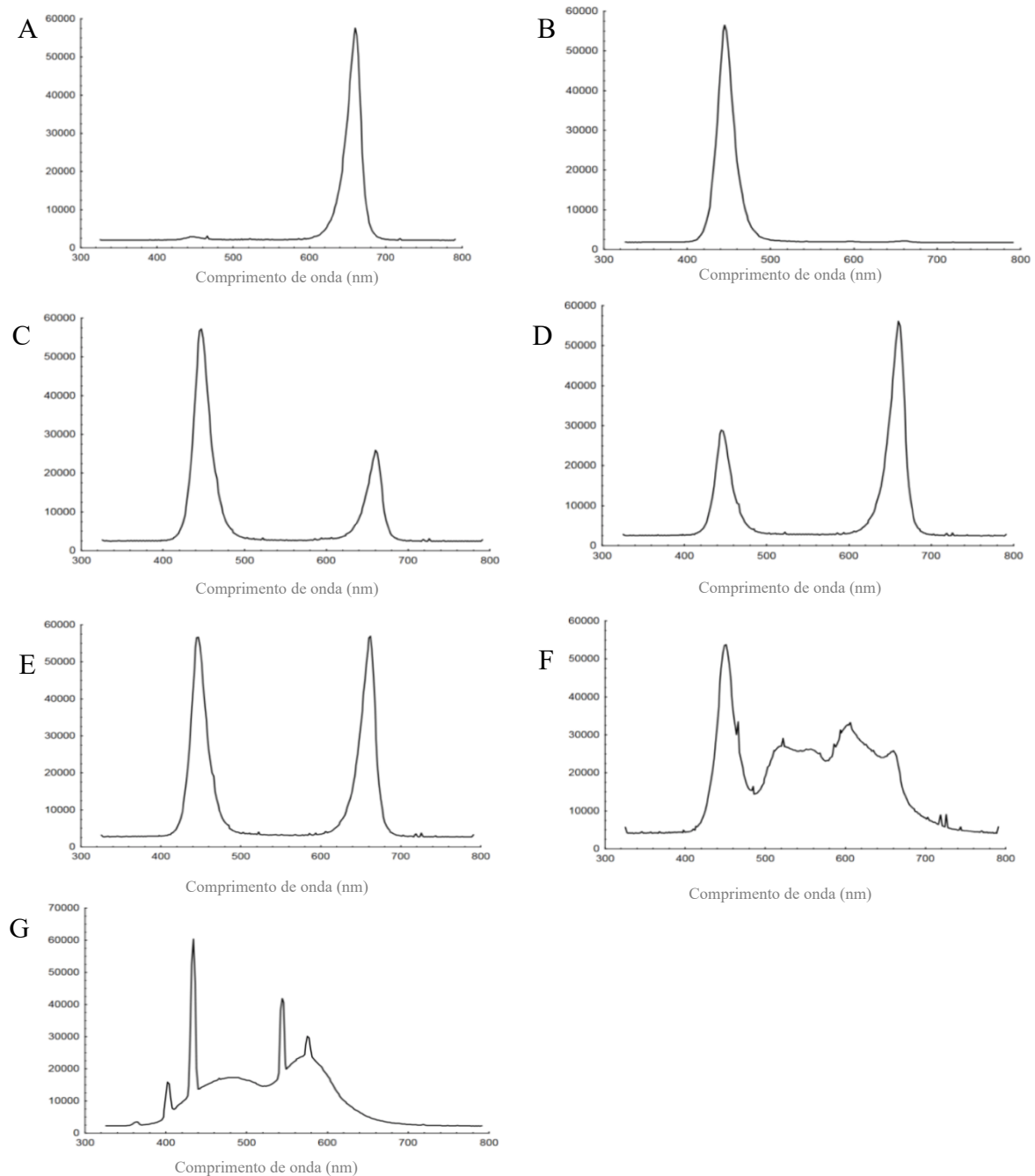
### 2.2 Influência da qualidade da luz

Segmentos nodais (correspondentes ao 1º e 2º par de folhas – contando a partir do ápice) das plântulas de urtiga já pré-estabelecidas, foram padronizados em, aproximadamente, 1 cm com auxílio de um bisturi. Em seguida, foram inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado

(DIC), sendo 7 tratamentos com 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição, um explante por tubo.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, onde foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz (LED): azul, vermelho; 1azul: 2,5vermelho; 2,5azul:1vermelho; 1azul:1vermelho; branco e sob lâmpada fluorescente branca fria (Controle) ( $39 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (FIGURA 1).

Figura 1 - Espectros de luz utilizados no experimento de qualidade de luz.



Legenda = A: LED Vermelho; B: LED Azul; C: LED 1 vermelho:2,5 azul; D: LED 2,5 vermelho:1 azul; E: LED 1vermelho:1 azul; F: LED Branco; G: Lâmpada fluorescente branca fria.

### 2.3 Influência da intensidade de luz

Segmentos nodais (correspondentes ao 1º e 2º par de folhas – contando a partir do ápice), provenientes de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, foram padronizados em aproximadamente 1 cm de comprimento em capela de fluxo laminar e inoculados na vertical em tubos de ensaio, contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos (intensidades de luz: 26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição e um explante por tubo.

### 2.4 Condições gerais dos experimentos

Após inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 26±1 °C, e cultivados por 40 dias em diferentes tratamentos de intensidade e qualidade de luz. As plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), número de segmentos nodais, número de folhas, matéria seca da folha (mg), matéria seca do caule (mg), matéria seca da raiz (mg), matéria seca total (mg), pigmentos fotossintetizantes, área foliar, compostos fenólicos totais e flavonoides totais e potencial antioxidante pelos métodos de Capacidade Antioxidante Total (CAT), DPPH e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).

#### 2.4.1 Análise do crescimento

O comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR) foram determinados com o auxílio de uma régua, medindo-se da base da brotação até o meristema apical e da base da brotação até a extremidade da maior raiz, respectivamente. Para obter os valores de matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC) e raiz (MSR), as respectivas partes foram separadas com auxílio de um bisturi, acondicionadas em sacos de papel kraft e desidratadas em estufa de circulação de ar forçado, a 37°C, por 72h. Posteriormente, o material seco foi pesado em balança de precisão. Para determinar a área foliar, foram utilizadas 5 plântulas representativas por tratamento. Todas as folhas tiveram sua área foliar mensurada por meio do software WinFOLIATM e scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO.

## 2.4.2 Análise de pigmentos fotossintéticos

A clorofila *a*, clorofila *b*, relação *a/b*, clorofila total e carotenoides foram extraídas e analisadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Hiscox e Israelstam (1979). Utilizando somente o segundo par de folhas das plântulas, 50 mg de folhas frescas de cada tratamento foram coletados e pesados em balança de precisão, em sala escura iluminada somente com luz verde. Em tubos do tipo Falcon, envoltos em papel alumínio, a matéria fresca foi incubada com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em estufa, à temperatura de 65 °C, por 24h. As amostras foram preparadas em triplicatas.

Após esse período, alíquotas de 3 mL do conteúdo foram coletadas e transferidas para cubetas de quartzo, sendo feita a leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda 480 nm (carotenoides) 649 nm (clorofila *a*) e 665 nm (clorofila *b*). O espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control ® (versão 3.37) foi utilizado para a leitura da densidade óptica. As concentrações de clorofila e carotenoides tiveram seus resultados expressos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca de tecido foliar (mg g<sup>-1</sup>), calculados de acordo com as seguintes equações, segundo a metodologia de Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times A_{480} - 1,29 \times A_{649} - 53,78 \times A_{665})/220.$$

Onde,  $A_{665,1}$ = absorvância mensurada a 665 nm;  $A_{649,1}$ = absorvância mensurada a 649 nm;  $A_{480}$ = absorvância mensurada a 480 nm.

## 2.4.3 Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

Para ensaios antioxidantes, foram avaliados os compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante por diferentes métodos: DPPH, CAT e ORAC.

### 2.4.3.1 Preparação extrativa e condições gerais

Folhas secas de *Urtica dioica* foram pulverizadas em gral e pistilo. Uma alíquota de 15 mg do pó de *U. dioica* foi pesada diretamente em microtubos. Aos microtubos adicionaram-se 2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), os quais foram vortexados por 5 segundos e

submetidos à extração por sonicação por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer a -20 °C, até as análises.

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas na leitora de microplacas TECAN INFINITY M200 PRO, operada com o sistema de processamento de dados I-control® versão 3.37. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

#### **2.4.3.2 Fenóis Totais**

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em microtubos de 2 mL, foram adicionados 50 µL do extrato, 130 µL de solução etanólica de Folin-Ciocalteu (10%) e 130 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,0%). As amostras foram incubadas por 2 horas no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente, 300 µL foram adicionados em microplacas de 96 poços e a absorbância foi lida a 760 nm.

A curva de calibração foi constituída com padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich®, ≥ 98%) na faixa de 0,0078 a 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, gerando a equação  $y = 6,2873x + 0,9239$  ( $R^2 = 0,9986$ ). A partir da equação da reta, foi possível calcular o acúmulo dos compostos fenólicos totais, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de matéria seca de folha (mgEAG gMSF<sup>-1</sup>).

#### **2.4.3.3 Flavonas/Flavonóis Totais**

Para quantificar os flavonoides presentes nos extratos, foi utilizada a metodologia de Atanassova, Georgieva e Ivancheva (2011), com modificações do método. Em microtubos de 2 mL, 100 µL da amostra foram adicionados a 100 µL de água destilada e 50 µL de NaNO<sub>2</sub>. Em seguida, os microtubos passaram por agitação no vortex e, após 5 minutos, 50 µL de AlCl<sub>3</sub> foram adicionados à solução. Alíquota de 100 µL de NaOH (1 M) foi adicionada após 6 minutos. Posteriormente, 200 µL das amostras foram pipetados em microplacas de 96 poços e a absorbância mensurada a 510 nm. Como controle, foram utilizados 100 µL da amostra, 300 µL de água destilada. Como branco, foram utilizados 100 µL da amostra, 100 µL de NaOH (1 M) e 200 µL de água destilada. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

A curva de calibração foi obtida a partir do padrão quercetina (Sigma-Aldrich®, ≥ 95%) diluído na faixa de 0,0625 a 1,0 mg mL<sup>-1</sup> ( $y = 3,72x + 0,2596$ ,  $R^2 = 0,9901$ ). A partir da

equação da reta, calcularam-se os acúmulos de flavonoides nas amostras, sendo os resultados expressos em miligrama equivalente de quercetina por grama de matéria seca de folha (mgEQ gMSF<sup>-1</sup>).

#### 2.4.3.4 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada utilizando a metodologia de redução do molibdato (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), com modificações. Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL do extrato de cada tratamento e 1 mL da solução reagente CAT (fosfato de sódio monobásico (28 mM), molibdato de amônio (4 mM) e ácido sulfúrico (0,6 M), em iguais proporções). Os microtubos foram incubados a 95 °C por 90 minutos e, em seguida, resfriados à temperatura ambiente. Posteriormente, 200 µL das amostras foram pipetados em microplacas de 96 poços e a absorbância mensurada a 695 nm.

A CAT foi determinada, usando uma curva de calibração do padrão ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®, ≥ 99,7%) nas concentrações de 0,002 a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, cuja equação da reta foi  $y = 6,80x + 0,0716$  ( $R^2 = 0,9946$ ). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido ascórbico por grama de matéria seca de folha (mgEAA gMSF<sup>-1</sup>).

#### 2.4.3.5 Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

O método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil) foi utilizado para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos, segundo metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Para as análises, solução etanólica 92,8° GL de DPPH (60 µg mL<sup>-1</sup>), mantida em abrigo da luz e refrigeração, foi utilizada. Para cada amostra, foram empregadas as soluções extrativas originais (7,5 g mL<sup>-1</sup>) e diluições sequenciais em MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 até 1/128. Em microplacas de 96 poços, alíquotas de 250 µL da solução DPPH foram adicionadas a 50 µL das amostras, as quais foram incubadas por 60 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância foi lida a 517 nm. A porcentagem de eliminação do radical DPPH foi calculada a partir da fórmula:

$$\%AA = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100$$

Onde,  $A_0$  corresponde à absorbância da solução etanólica do DPPH e  $A_1$  corresponde à absorbância da solução DPPH + extrato. A atividade de eliminação de radicais livres foi

expressa como  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), correspondendo à concentração do extrato capaz de inibir 50% dos radicais DPPH.

#### **2.4.3.6 Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)**

A análise foi baseada no método de Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), com modificações. Em microplacas pretas de 96 poços, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  da amostra e 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (70 mM) preparada em tampão fosfato (75 mM e pH 7,4). A microplaca foi pré-incubada durante 10 minutos, a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do radical AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato] (12 mM), sendo a fluorescência registrada a cada minuto, por 150 minutos. Como controle, foi utilizado o padrão Trolox nas concentrações de 0,25 a 0,015625  $\text{mg mL}^{-1}$ . Como branco foram utilizados 30  $\mu\text{L}$  do tampão fosfato (75 mM e pH 7,4) em substituição do AAPH. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

Os resultados foram calculados usando uma equação de regressão entre a concentração de Trolox e a AUC (área sobre a curva) líquida ( $AUC_{\text{amostra}} - AUC_{\text{branco}}$ ), sendo os valores de ORAC expressos como mg de equivalente de Trolox por grama de matéria seca da folha ( $\text{mgET gMSF}^{-1}$ ).

### **2.5 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software R Development Core Team (2012).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Qualidade de luz

Após 40 dias, as plântulas sob diferentes qualidades de luz foram avaliadas quanto ao crescimento, produção de matéria seca, pigmentos fotossintéticos, doseamento dos compostos fenólicos, flavonoides e ensaios antioxidantes.

##### 3.1.1 Análise do crescimento

A qualidade da luz influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento *in vitro* da espécie (TABELA 1). De modo geral, os melhores resultados de crescimento foram observados nas plântulas cultivadas sob LED 2,5V:1A (TABELA 1), apresentando maior crescimento de raiz (2,09 cm), número de folhas (9,90), número de segmentos nodais (4,95) e os maiores valores de matéria seca (FIGURA 4). Estudos recentes relataram aumento da atividade fotossintética de plântulas *in vitro* cultivadas sob combinações de vermelho e azul, promovendo o aumento da produção de matéria seca (HERNANDES; KUBOTA, 2014; TAULAVUORI, 2018), corroborando os resultados observados neste estudo.

Figura 2 - Plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019.



Fonte: Do Autor (2019).

No cultivo da espécie sob luz monocromática vermelha, observou-se o maior comprimento de parte aérea (12,03 cm) e os internos mais distanciados, evidenciando uma

característica de plântula estiolada (FIGURA 2 e TABELA 1). O alongamento do caule sob luz vermelha pode ser uma resposta hormonal endógena na plântula, associada à giberelina. Segundo Kamiya e Garcia-Martinez (1999), a luz vermelha é responsável pela ativação dos genes responsáveis pela produção de giberelina. Estudos reportam a influência da luz vermelha monocromática como indutora no crescimento da parte aérea de plântulas micropropagadas (JEONG; SIVANESAN, 2018; HUNG et al., 2016; SILVA et al., 2017). Foi possível observar uma relação diretamente proporcional entre o aumento da proporção da luz vermelha e a indução do crescimento da parte aérea (FIGURA 3).

Tabela 1 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de folhas (NF) e número de segmentos nodais (NSN) de plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. 2019.

Tratamentos	CPA (cm)	CR (cm)	NF	NSN
Vermelho	12,03a	0,66c	7,60b	3,80b
2,5V:1A	7,81b	2,09a	9,90a	4,95a
1V:2,5A	4,05c	0,58c	5,70c	2,85c
Azul	3,14c	1,07c	5,90c	2,95c
1V:1A	4,64c	0,76c	8,10b	4,05b
Branco	6,26b	0,85c	6,20c	3,10c
Fluorescente	6,39b	1,41b	7,30b	3,65b
C.V. (%)	18,31	29,74	9,39	9,70

Legenda: V= Vermelho; A=Azul. Lavras, 2019. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Neste estudo, o uso do LED vermelho promoveu o menor comprimento de raiz (0,66 cm) (TABELA 1) e os menores valores de matéria seca da folha (1,95 mg planta<sup>-1</sup>), caule (2,86 mg planta<sup>-1</sup>), raiz (0,69 mg planta<sup>-1</sup>), parte aérea (4,81 mg planta<sup>-1</sup>) e matéria seca total (5,50 mg planta<sup>-1</sup>) (FIGURA 4). Em razão da sua plasticidade morfológica e fisiológica, as plantas se ajustam às condições de luminosidade (YANG et al., 2018; TAIZ et al., 2017) e podem utilizar seus fotoassimilados para o crescimento do caule ao custo de desenvolver folhas e raízes (PARK; RUNKLE, 2017). Em contrapartida, o aumento da proporção do comprimento de onda do azul nos LEDs promoveu menores valores de CPA (FIGURA 3). A luz azul visível possui um menor comprimento de onda e, por consequência, maior energia (TAIZ et al., 2017). Neste estudo, a grande quantidade de energia contida no comprimento de onda da luz azul induziu a planta a deslocar os fotoassimilados para a biossíntese de metabólitos secundários responsáveis pela proteção do aparato fotossintético, ao custo de promover o seu alongamento.

Figura 3 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA) dos tratamentos contendo comprimentos de onda azul (A) e vermelho (V) utilizados no experimento com plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019.

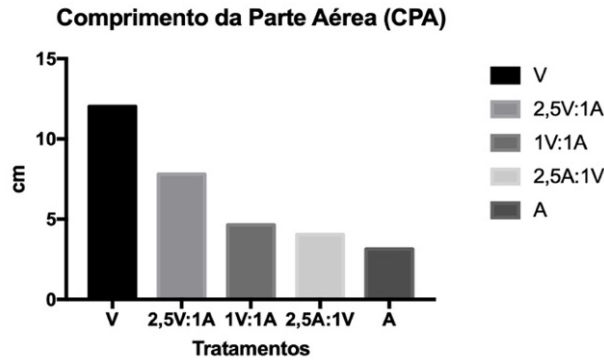
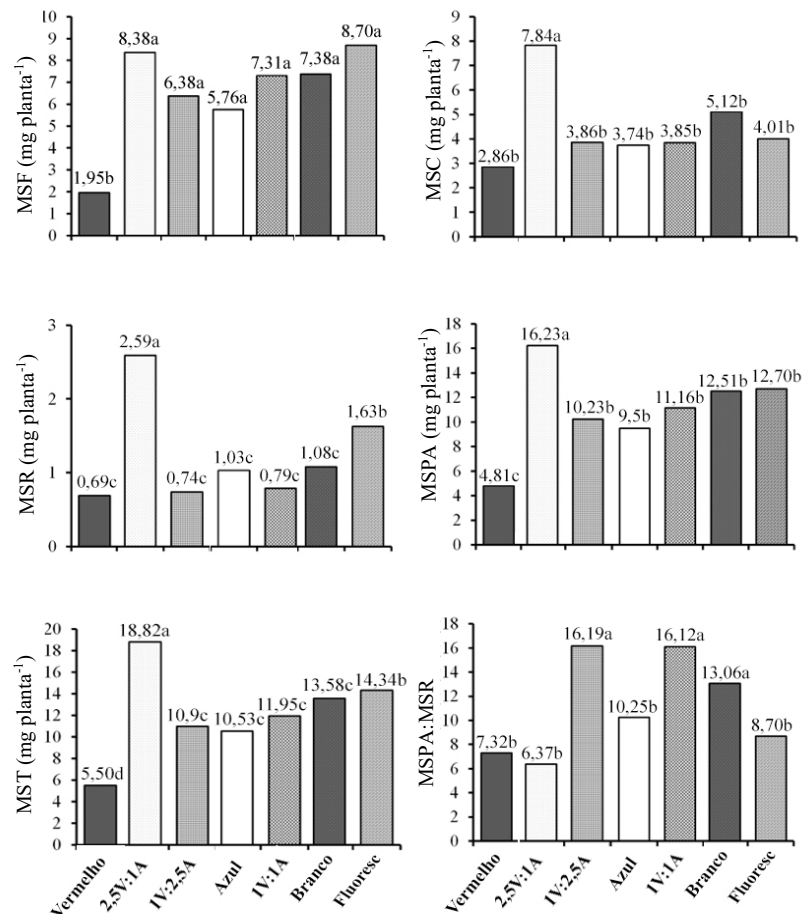


Figura 4 - Matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), total (MST) e razão matéria seca da parte aérea: raiz (MSPA:MSR) de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019.



As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: V: vermelho; A: azul.

### 3.1.2 Análise de pigmentos fotossintéticos

O aparato fotossintético da *Urtica dioica*, avaliado pelos teores de pigmentos fotossintéticos, demonstrou sensibilidade frente às variações espectrais de luz (TABELA 2). O uso de LED azul e branco não diferiu do uso de lâmpadas fluorescentes (controle) quanto à concentração de clorofila nas plântulas de *Urtica dioica*. Segundo Kwon et al. (2015), o comprimento de onda da luz azul, também contido na luz branca e fluorescente, é importante na síntese da clorofila, assim como no desenvolvimento do cloroplasto e na fotomorfogênese. A luz azul regula a ativação de enzimas e aumenta a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese da clorofila (FAN et al., 2013; RUYTERS, 1984).

O LED azul, 1V:2,5A e 2,5V:1A e a lâmpada fluorescente proporcionaram os melhores valores da razão clorofila a/b para a *U. dioica*. Esses resultados indicam uma maior capacidade de transporte de elétrons, proporcionando uma fotossíntese mais eficiente (ZHENG; VAN LABEKE, 2017). De acordo com os resultados do presente estudo, é possível que os fotoassimilados produzidos nas plântulas sob LED azul e lâmpada fluorescente tenham sido direcionados para a produção de clorofila e carotenoides (TABELA 2) e não utilizados no crescimento das plântulas ou na conversão de compostos fenólicos e flavonoides. Em contrapartida, o produto da fotossíntese das plantas sob LED 1V: 2,5A parece ter sido direcionado para a produção de compostos fenólicos e flavonoides (TABELA 7), enquanto sob o LED 2,5V:1A foram empregados na maior produção de matéria seca (FIGURA 4).

Plântulas cultivadas sob LEDs contendo proporções de vermelho (V; 1V:1A; 2,5V:1A; 1V:2,5A) apresentaram valores inferiores quanto à clorofila *a* e *total* (TABELA 2). O comprimento de onda do vermelho reduz a biossíntese de clorofila, atuando na diminuição do ácido-5 aminolevulínico, precursor na produção da clorofila (ZHENG; VAN LABEKE, 2017). No presente estudo, observou-se que o uso de LED vermelho monocromático levou à baixa concentração de pigmentos fotossintéticos promovendo, como consequência, uma fotossíntese deficiente e uma baixa produção de matéria seca (FIGURA 4).

A qualidade de luz atua diretamente na regulação da biossíntese de carotenoides, sendo a resposta espécie-específica (ZHANG et al., 2015). Observou-se que nos tratamentos contendo comprimento de luz do vermelho, a produção de carotenoides foi menor (TABELA 2). O acúmulo de carotenoides se relaciona aos níveis giberelina nas plantas (MOHANTY et al., 2016), uma vez que possuem o geranylgeranyl-difosfato (GGPP) como precursor em comum na sua rota biossintética (RUIZ-SOLA; RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2012). Pode-se correlacionar essa menor produção de carotenoides com o aumento do CPA, sugerindo que

a planta utilizou seus fotoassimilados para a produção de giberelinas, uma vez que os genes de biossíntese de giberelinas são ativados, quando os fitocromos recebem luz vermelha, controlando o alongamento do caule das plântulas (KAMIYA; GARCIA-MARTINEZ, 1999).

Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos presentes em plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de segmentos nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 40 dias. 2019.

Tratamentos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides	Relação a/b
Vermelho	0,44b	0,18b	0,62b	0,12b	2,45b
2,5V:1A	0,56b	0,16c	0,72b	0,15b	3,51a
1V:2,5A	0,58b	0,15c	0,73b	0,13b	3,99a
Azul	0,80a	0,18b	0,98a	0,18a	4,36a
1V:1A	0,56b	0,14c	0,70b	0,13b	3,94b
Branco	0,72a	0,28a	1,00a	0,17a	2,58b
Fluorescente	0,77a	0,20b	0,97a	0,17a	3,85a
C.V.	13,20	8,04	11,27	7,90	12,12

Legenda: V= Vermelho; A=Azul. Lavras, 2018. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.1.3 Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto à concentração dos compostos fenólicos, flavonoides e atividades antioxidantes de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro* (TABELA 3). O uso do LED 1V:2,5A proporcionou um aumento de 5,53 vezes na concentração de compostos fenólicos e 8,63 vezes na concentração dos flavonoides em relação ao controle. Ao induzir a biossíntese desses compostos, a planta se torna mais resistente a doenças e a estresses ambientais (JING et al., 2018).

Plantas respondem ao ambiente de maneira distinta, alocando seus fotoassimilados para a biossíntese de elementos necessários à sua sobrevivência e adaptação às condições ambientais oferecidas pelas diferentes fontes de luz. Lobiuc et al. (2017), ao estudarem o efeito de LEDs vermelho, azul e branco na produção de compostos fenólicos e flavonoides em manjerição (*Ocimum basilicum* L.), observaram que os maiores valores foram obtidos com combinação dos LED vermelho e azul (2V:1A). VAŠTAKAITE et al. (2015), ao estudarem o efeito do LED azul em *microgreens*, concluíram que proporções de 16 a 33% de luz azul são necessárias para causar estresse luminoso e, como consequência, um aumento do conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e da atividade antioxidante. A qualidade de luz afeta a biossíntese de compostos fenólicos e flavonoides nas plantas, com a resposta das plantas à luz

azul e vermelha dependente de cada espécie e das condições de cultivo (HUCHÉ-THÉLIER et al., 2016; LOBIUC et al., 2017; PEDROSO et al., 2017; TAULAVUORI et al., 2018).

Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro* sob diferentes intensidades de luz aos 40 dias. Lavras, 2019.

Qualidade	CFT	FT	DPPH	CAT	ORAC
Vermelho	11,85b	7,01c	125,48c	4,58b	682,0b
2,5V:1A	12,33b	8,95b	78,86b	3,97b	593,2b
1V:2,5A	21,44a	16,77a	73,10a	8,31a	1356,3a
Azul	11,82b	9,50b	98,75b	4,22b	584,7b
1V:1A	14,36b	9,84b	111,79b	4,39b	679,5b
Branco	12,93b	2,79d	98,89b	4,54b	721,2b
Fluorescente	3,88c	1,06e	152,85d	0,12c	190,9c
CV (%)	10,31	9,23	13,93	15,67	11,19

Legenda: MSF= matéria seca da folha; V= Vermelho; A=Azul. Lavras, 2019. CFT: expresso em mg equivalentes de ácido gálico/g de folha seca (mg EAG gMSF<sup>-1</sup>); CF: expresso em mg equivalentes de quercetina/g de folha seca (mg EQ gMSF<sup>-1</sup>); DPPH: captura de radicais livres de DPPH, expresso em IC<sub>50</sub>; CAT: capacidade antioxidante total expressa em mg equivalentes de ácido ascórbico/g de folha seca (mg EAA gMSF<sup>-1</sup>); ORAC: capacidade de absorção do radical oxigênio em mg equivalente de Trolox/g de folha seca (mg ET gMSF<sup>-1</sup>). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os testes antioxidantes DPPH, CAT e ORAC, os melhores resultados foram proporcionados pelo uso do LED 1V:2,5A (TABELA 3), tratamento que permitiu o maior acúmulo dos compostos fenólicos e flavonoides, podendo inferir que esses compostos são responsáveis pela atividade antioxidante da espécie. Os principais compostos bioativos com atividade antioxidante na urtiga são os compostos fenólicos quercetina, rutina, isoquercitrina e o ácido 5-0-cafeoilquínico (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016; ORČIĆ et al., 2014). Esses compostos apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante (ROGERIO et al., 2007; AO et al., 2008; KARIMI et al., 2013).

### 3.2 Intensidade de luz

Após 40 dias, as plântulas sob diferentes intensidades de luz foram avaliadas quanto ao crescimento, produção de matéria seca, pigmentos fotossintéticos, doseamento dos compostos fenólicos e ensaios antioxidantes.

### 3.2.1 Análise do crescimento

As variáveis de crescimento *in vitro* avaliadas não foram afetadas pelas diferentes intensidades de luz, exceto para o comprimento da maior raiz (CR). Observou-se um comprimento da parte aérea (CPA) de 7,61 a 8,41 cm, número de folhas por plântula (NF) de 6,9 a 7,9 e número de segmentos nodais (NSN) de 3,45 a 3,95. Observou-se um estiolamento nas plântulas sob 26 a 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apresentando caules finos e esbranquiçados, em comparação com os tratamentos 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (FIGURA 5).

Plântulas cultivadas sob intensidades a partir de 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram os melhores resultados quanto ao comprimento da maior raiz (CR) e área foliar total (AFT), variando de 1,89 a 4,20 cm e 11,38 a 13,15  $\text{cm}^2$ , respectivamente. A área foliar tem relação direta com a interceptação da energia luminosa, levando a uma maior conversão dos fótons em fotoassimilados e, conseqüentemente, a maiores valores de matéria seca (SANQUETTA et al., 2014), corroborando os resultados observados nesse experimento. As condições de luminosidade afetam o balanço hormonal e a distribuição de auxina nas plantas, promovendo alterações fisiológicas, como maior produção de raízes (HALLIDAY; MARTÍNEZ-GARCÍA; JOSSE, 2009). Yang et al. (2018), ao estudarem a influência da luminosidade na produção de auxina em plantas de soja (*Glicine max* (L.) Merr.), concluíram que a concentração endógena deste fitohormônio é regulada pela intensidade e qualidade de luz.

Figura 5 - Plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* nas intensidades 26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aos 40 dias. Lavras, 2019

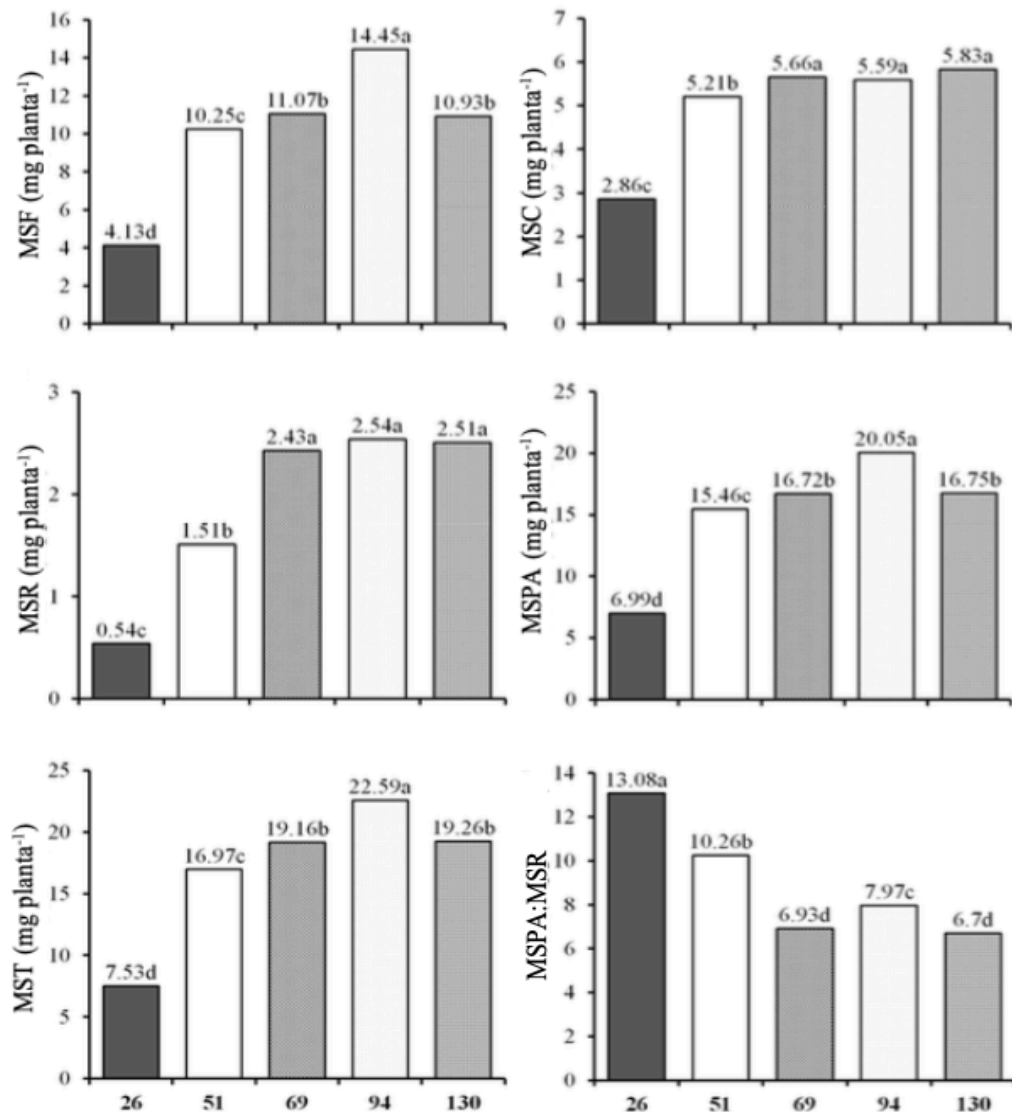


Fonte: do Autor (2019).

Diferentes intensidades de luz influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA) e

na matéria seca total (MST) (FIGURA 6). Um maior ganho de matéria seca do caule e da raiz foi observado a partir de  $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A intensidade de  $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi superior a todos os outros tratamentos quanto a matéria seca das folhas ( $14,45 \text{ mg planta}^{-1}$ ), da parte aérea ( $20,05 \text{ mg planta}^{-1}$ ) e matéria seca total ( $22,59 \text{ mg planta}^{-1}$ ).

Figura 6 - Matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), total (MST) e razão matéria seca da raiz:caule (R:S) de plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019.



As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

Os menores valores de matéria seca foram observados em plântulas cultivadas a  $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (FIGURA 6). De modo geral, plantas cultivadas em ambientes de baixa luminosidade apresentam menores valores de biomassa, em razão da baixa produção de



fotoassimilados, resultado de uma fotossíntese ineficiente (TAIZ et al., 2017). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2017), ao estudarem o efeito de diferentes intensidades de luz (26, 51, 69, 94 e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no cultivo *in vitro* de *Plectranthus amboinicus*, onde plântulas cultivadas sob 26  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram os piores valores em produção de matéria seca.

O melhor resultado quanto à razão parte aérea: raiz (MSPA:MSR) foi observado nas plântulas cultivadas sob 26  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (FIGURA 6). Diferenças na relação parte aérea/raiz são respostas observadas em plantas expostas a diferentes intensidades luminosas (FERNANDES et al., 2013). Os menores valores encontrados foram nas intensidades 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , indicando que plântulas cultivadas nessa intensidade têm maior produção de raiz e, conseqüentemente, uma melhor absorção de água e sais minerais.

### 3.2.2 Análise de Pigmentos Fotossintéticos

As diferentes intensidades de luz afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de pigmentos fotossintéticos nas plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro* (TABELA 4). Os melhores resultados quanto à clorofila *a*, clorofila total e relação *a/b* foram observados nas intensidades 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em plântulas cultivadas sob 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram observadas maiores concentrações de clorofila *b* (0,28  $\text{mg g}^{-1}$ ). A utilização da intensidade de luz 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favoreceu a biossíntese de carotenoides nas plântulas cultivadas *in vitro* (0,25  $\text{mg g}^{-1}$ ). Intensidade da luz é um dos fatores-chave na regulação dos genes responsáveis pela biossíntese de clorofilas e carotenoides (ZHANG et al., 2015).

Tabela 4 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Intensidades ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides	Relação <i>a/b</i>
26	0,77b	0,23b	1,00b	0,18b	3,43d
51	1,07a	0,28a	1,35a	0,25a	3,81a
69	0,85b	0,23b	1,08b	0,19b	3,63c
94	0,96a	0,25b	1,21a	0,21b	3,84a
130	0,87b	0,23b	1,10b	0,20b	3,72b
C.V.	7,26	6,63	7,11	7,28	1,55

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Kukrić et al. (2012) reportaram valores similares ao presente estudo para as quantidades de clorofila *a* ( $0,882 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$ ), clorofila *b* ( $0,285 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ ), clorofila total ( $1,174 \pm 0,006 \text{ mg g}^{-1}$ ) e carotenoides ( $0,323 \pm 0,006 \text{ mg g}^{-1}$ ) ao estudar urtigas selvagens colhidas na República Sérvia, durante o verão. Nos últimos anos, pesquisas têm visado ao aumento da concentração dos carotenoides nas plantas, por via da manipulação do ambiente de cultivo e modificações genéticas (HUANG et al., 2013).

Ambientes de baixa luminosidade interferem no processo da fotossíntese, afetando a produção de pigmentos fotossintéticos assim como a relação entre eles (ZHAO; HAO; TAO, 2012). Há uma correlação entre uma maior intensidade de luz e a redução da concentração de pigmentos fotossintetizantes, em decorrência da fotodegradação (SILVA et al., 2017). Entretanto, a *Urtica dioica* não apresentou o mesmo comportamento, provavelmente por sua plasticidade. A alta adaptabilidade e rusticidade da urtiga permitiram a propagação da espécie por todo o mundo, sendo encontrada em ambientes sombreados, como florestas densas, e em áreas degradadas à plena-luz (TAYLOR, 2009). De acordo com Zhou, Hao e Tao (2012), diferentes espécies *in vitro* necessitam de condições distintas de luminosidade, se adaptando morfológica e fisiologicamente a diferentes intensidades de luz de forma singular.

### 3.2.3 Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos quanto aos teores de fenóis e flavonoides totais de *U. dioica*, assim como nas atividades antioxidantes avaliadas (TABELA 5). A concentração de compostos fenólicos totais variou de 5,40 a 9,83 mgEAG gMSF<sup>-1</sup>, sendo o melhor resultado observado nas plântulas sob a irradiância de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . O aumento da intensidade de luz leva a uma maior produção de fotoassimilados até um nível onde começam a ocorrer reações prejudiciais à planta, causadas pelo estresse luminoso (TAIZ et al., 2017). O aumento da intensidade luminosa estimula a produção de compostos fenólicos nas plantas, com função de proteção do aparato fotossintético (WARREN et al., 2003).

A maior produção de flavonoides e antioxidantes foram observadas em plântulas cultivadas a  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (TABELA 5). Nessa irradiância, exibiram maior atividade antioxidante pelos métodos ORAC ( $1107,0 \text{ mg ET gMSF}^{-1}$ ), CAT ( $5,66 \text{ mgEAA gMSF}^{-1}$ ) e DPPH ( $253,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A luz é um dos fatores ambientais diretamente ligados à produção de metabólitos secundários como os compostos fenólicos e os flavonoides (JING et al., 2018; TAULAVUORI et al., 2018). Normalmente, a plântula *in vitro* produz menor quantidade de

cera nas folhas, o que ocasiona uma menor proteção das folhas. Assim, o aumento da intensidade de luz pode ter levado a uma situação de estresse luminoso, onde a planta acumulou compostos fenólicos e flavonoides para proteção das clorofilas. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), há uma correlação positiva entre intensidade de luz e produção de compostos fenólicos, como os flavonoides, uma vez que esses metabólitos secundários absorvem e dissipam a energia luminosa, reduzindo os danos ao aparato fotossintético.

Tabela 5 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, sob diferentes intensidades de luz aos 40 dias. Lavras, 2019.

<b>Intensidades</b> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	<b>CFT</b>	<b>FT</b>	<b>DPPH</b>	<b>CAT</b>	<b>ORAC</b>
26	5,40b	2,98c	580,4e	3,34b	720,7d
51	5,63b	3,84b	502,7d	3,73b	827,7c
69	5,73b	4,09b	416,6c	4,14b	913,0b
94	6,60b	4,46b	355,1b	3,05b	948,1b
130	9,83a	6,55a	253,9a	5,66a	1107,0a
C.V.	12,38	11,30	4,83	11,56	4,21

As médias, seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. Legenda: CFT: expresso em mg equivalentes de ácido gálico/g de folha seca (mg EAG gMSF<sup>-1</sup>); CF: expresso em mg equivalentes de quercetina/g de folha seca (mg EQ gMSF<sup>-1</sup>); DPPH: captura de radicais livres de DPPH, expresso em IC<sub>50</sub>; CAT: capacidade antioxidante total expressa em mg equivalentes de ácido ascórbico/g de folha seca (mg EAA gMSF<sup>-1</sup>); ORAC: capacidade de absorção do radical oxigênio em mg equivalente de Trolox/g de folha seca (mg ET gMSF<sup>-1</sup>).

Observaram-se poucos tricomas nas plântulas cultivadas *in vitro*. Segundo Pollard e Briggs (1982), a *Urtica dioica* quando cultivada em ambiente de sombra e baixa luminosidade apresenta poucos tricomas em relação àquelas cultivadas a pleno sol.



#### 4 CONCLUSÕES

A intensidade e qualidade de luz afetam o crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos e atividade antioxidante das plântulas de *Urtica dioica*. A intensidade de  $94 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporciona as melhores condições luminosas para a micropropagação da espécie *in vitro* e produção de matéria seca das folhas. A produção de pigmentos fotossintéticos é favorecida pelo uso de  $51 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As concentrações de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante aumentam em maiores intensidades da luz. A atividade antioxidante é diretamente proporcional ao aumento da intensidade de luz, sendo indicado o uso de  $130 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O LED 2,5 V:1A favorece o crescimento e acúmulo de matéria seca *in vitro*. O uso do LED 1V: 2,5A proporciona um aumento de 5,53 vezes na concentração de compostos fenólicos e 8,63 vezes na concentração dos flavonoides, em relação ao uso de lâmpadas fluorescentes. O aumento à proporção da luz vermelha induz o estiolamento da plântula.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- AO, C.; LI, A.; ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. **Food Control**, v.19, n.1, p. 990-994, 2008.
- ATANASSOVA, M.; GEORGIEVA, S.; IVANCHEVA, K. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 46, n.1, p. 81-88, 2011.
- BELLO-BELLO, J. J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J. H.; MORALES-RAMOS, V. Effect of LED quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n.8, p. 272-277, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 3, 433-447, 2018.
- CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest plantlets to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, v. 80, n.1, p. 245-255, 1996.
- DI VIRGILIO, N.; PAPAZOGLU, E. G.; JANKAUSKIENE, Z.; DI LONARDO, S.; PRACZYK, M.; WIELGUSZ, K. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. **Industrial Crop and Products**, v. 68, n.1, p. 42-49, 2015.
- FAN, X. X.; ZANG, J.; XU, Z.G.; GUO, S. R.; JIAO, X. L.; LIU, X. Y.; GAO, Y. Effects of different light quality on growth, chlorophyll concentration and chlorophyll biosynthesis precursors of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p. 2721-272, 2013.
- FATTAHI, S.; GHADAMI, E.; ASOURI, M.; MOTEVALIZADEH, A. A.; AKHAVAN-  
NIAKI, H. *Urtica dioica* inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting Ornithine decarboxylase and Adenosine deaminase as key regulatory enzymes in adenosine and polyamines homeostasis in human breast cancer cell lines. **Cell Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 97-102, 2018.
- FERNANDES, V. F.; ALMEIDA, L. B. D.; FEIJÓ, E. V. D. S.; SILVA, D. D. C.; OLIVEIRA, R. A. D.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. D. B. Light intensity on growth, leaf

micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HALLIDAY, K. J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; JOSSE, E. Integration of Light and Auxin Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a001586, 2009.

HERNANDEZ, R.; KUBOTA, C. Physiological responses of cucumber plantlets under different blue and red photon flux rations using LEDs. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, n.1, p. 66-74, 2016.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chloro- phyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HUANG, J. C.; ZHONG, Y. J.; LIU, J.; SANDMANN, G.; CHEN, F. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. **Metabolomic Engineering**, v.17, n. 1, p. 59-67, 2013.

HUCHÉ-THÉLIER, L.; CRESPEL, L.; LE GOURRIEREC, J.; MOREL, P.; SAKR, S.; LEDUC, N. Light signaling and plant responses to blue and UV radiation-Perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, n. 1, p. 22-38, 2016.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; KIM, S. K.; LEE, K. H.; PARK, J. Y.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. Led light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically im- portant highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 152, 2016.

JAN, K. N.; ZARAFSHAN, K.; SINGH, S. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potencial. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 2, p. 423-433, 2016.

JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v. 236, n.1, p. 222-228, 2018.

JING, X.; WANG, H.; GONG, B.; LIU, S.; WEI, M.; AI, XIZHEN.; LI, Y.; SHI, Q. Secondary and sucrose metabolism regulated by different light quality combinations involved in melon tolerance to powdery mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 1, p. 77-87, 2018.

KAMIYA, Y.; GARCIA-MARTINEZ, J. L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 5, p. 398-403, 1999.

KUKRIĆ, Z. Z.; TOPALIĆ-TRIVUNOVIĆ, L. N.; KUKAVICA, B. M.; MATOŠ, S. B.; PAVIČIĆ, S. S.; BOROJA, M. M.; SAVIĆ, A. V. Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). **Acta Periodica Technologica (APTEFF)**, v. 43, n. 1, p. 257-272, 2012.

KWON, A. R.; CUI, H. Y.; LEE, H.; SHIN, H.; KANG, K. S.; PARK, S. Y. Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 65-74, 2015.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial crops and products**, v. 129, p. 35-44, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 1-13, 2018.

LIMA, N. G. P.; CABRAL, A. G.; FURTADO, F. F.; LIMA, I.; MACEDO, R. O. *Urtica dioica*: uma revisão dos estudos das suas propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n.3, p. 199-206, 2008.

LOBIUC, A.; VASILACHE, V.; PINTILIE, O.; STOLERU, T.; BURDUCEA, M.; OROIAN, M.; ZAMFIRACHE, M. Blue and red led illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. microgreens. **Molecules**, v. 22, n.1, p. 1-14, 2017.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. **Fisiologia Vegetal**. EPU/EDUSP, São Paulo, v. 1, n.2, p. 333-350, 1979.

MOHAMMADI, A.; MANSOORI, B.; AGHAPOUR, M.; BARADARAN, B. *Urtica dioica* dichloromethane extract induce apoptosis from intrinsic pathway on human prostate cancer cells (PC3). **Cell Molecular Biology**, v. 62, n. 3, p. 78-83, 2016.

MOHANTY, B.; LAKSHMANAN, M.; LIM, S. H.; KIM, J. K.; HA, S. H.; LEE, D. Y. Light-specific transcriptional regulation of the accumulation of carotenoids and phenolic compounds in rice leaves. **Plant Signaling & Behavior**, v. 11, n. 6, p. 3002-3020, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 1, p. 473-497, 1962.

ORČIĆ, D.; FRANCIŠKOVIĆ, M.; BEKVALAC, K.; SVIRČEV, E.; BEARA, I.; LESJAK, M.; MIMICA-DUKIĆ, N. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 48-53, 2014.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PARK, Y.; RUNKLE, E. S. Far-red radiation promotes growth of plantlets by increasing leaf expansion and whole-plant net assimilation. *Environmental and experimental botany*, v.136, n. 1, p. 41-49, 2017.



- PEDROSO, R. C. N.; BRANQUINHO, N. A. A.; HARA, A. C.; COSTA, A. C.; SILVA, F. G.; PIMENTA, L. P.; JANUARIO, A. H. Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marrubioides* plantlets cultivated *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 466-470, 2017.
- POLLARD, A. J.; BRIGGS, D. Genecological studies of *Urtica dioica* L. The nature of intraspecific variation in *U. dioica*. **New phytologist**, v. 92, n. 3, p. 453-470, 1982.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor-molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. **Industrial Crops and Products**, v. 105, n. 1, p. 225-230, 2017.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2012. Software.
- ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; DA SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 402-408, 2007.
- RUIZ-SOLA, M.A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway - The Arabidopsis book. **American Society of Plant Biologists**, v. 10, p. 1-28, 2012.
- RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. In Blue Light Effects in Biological Systems. **Proceedings in Life Sciences**, Germany, v. 1, p. 283–301, 1984.
- SANQUETTA, C. R.; BEHLING, A.; CORTE, A. D.; CADORI, G. C.; COSTA JUNIOR, S.; MACEDO, J. P. Eficiência de conversão da radiação fotossintética interceptada em Fitomassa de mudas de *Eucalyptus dunii* Maiden em função da densidade de plantas e do ambiente de cultivo. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 573-580, 2014.
- SARIKURKCU, C.; TARGAN, S.; OZER, M. S.; TEPE, B. Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. 560-572, 2017.
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 1, p. 144-158, 1965.

SNOWDEN, M. C.; COPE, K. R.; BUGBEE, B. Sensitivity of seven diverse species to blue and green light: interactions with photon flux. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0163121, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. 6<sup>a</sup> ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 858p.

TAULAVUORI, K.; PYYSALO, A.; TAULAVUORI, E.; JULKUNEN-TIITTO, R. Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, n. 1, p. 183-187, June, 2018.

TAYLOR, K. Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L., **Journal of Ecology**, v. 7, n. 1, p. 1436-1458, 2009.

UPTON R. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): extraordinary vegetable medicine. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-38, 2013.

VAŠTAKAITE, V.; VIRŠILE, A.; BRAZAITYTE, A.; SAMUOLIENE, G.; JANKAUSKIENE, J.; SIRTAUTAS, R.; DABAŠINSKAS, L.; SAKALAUŠKIENE, S.; MILIAUSKIENE, J. The Effect of Blue Light Dosage on Growth and Antioxidant Properties of Microgreens - Scientific Works of the Institute of Horticulture. **Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry**, v. 34, n. 1, p. 25-35, 2015.

WARREN, M. J.; BASSMAN, J.; FELLMAN, J. K.; MATTINSON, D. S.; EIGENBRODE, S. Ultraviolet-B radiation of *Populus trichocarpa* leaves. **Tree Physiology**, v. 23, n. 1, p. 527-535, 2003.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WITBOOI, H.; OKEM, A.; MAKUNGA, N. P.; KAMBIZI, L. Micropropagation and secondary metabolites in *Agathosma betulina* (Berg.). **South African Journal of Botany**, v. 111, n. 1, p. 283-290, 2017.

YANG, F.; FAN, Y.; WU, X.; CHENG, Y.; LIU, Q.; FENG, L.; LIU, W. Auxin-to-Gibberellin Ratio as a Signal for Light Intensity and Quality in Regulating Soybean Growth and Matter Partitioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 56, p. 1-13, 2018.

ZHANG, L.; MA, G.; YAMAWAKI, K.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YOSHIOKA, T.; KATO, M. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. **Journal of plant physiology**, v. 188, n.1, p. 58-63, 2015.

ZHENG, L; VAN LABEKE, M. C. Long-term effects of red-and blue-light emitting diodes on leaf anatomy and photosynthetic efficiency of three ornamental pot plants. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 917, 2017.



**CAPÍTULO 3 CRESCIMENTO *In vitro* E ACÚMULO DE COMPOSTOS  
ANTIOXIDANTES DE *Urtica dioica* L. MICROPROPAGADAS SOB DIFERENTES  
SISTEMAS DE VENTILAÇÃO NATURAL**

**RESUMO**

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae) é uma espécie rica em vitaminas e minerais, conhecida na medicina popular por ser eficaz no tratamento dos sintomas da artrite, diabetes, reumatismo e hiperplasia benigna prostática. De acordo com estudos recentes, seus compostos fenólicos e flavonoides podem ser os responsáveis por sua atividade antioxidante. Dessa forma, neste estudo, objetivou-se avaliar o uso do sistema de ventilação natural no crescimento e no acúmulo de compostos secundários em plântulas de *U. dioica* micropropagadas. Dois tipos de explantes (segmentos nodais e apicais) com um par de folhas foram cultivados na ausência e presença de sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), em 4 diferentes sistemas de cultivo: sistema de cultivo convencional (sem membranas), com uma membrana (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Após 40 dias, o crescimento, área foliar, matéria seca, pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante foram avaliados. O sistema de ventilação natural foi superior ao convencional quanto aos parâmetros de crescimento e produção de matéria seca das plantas. Os melhores resultados quanto à micropropagação da espécie foram observados com o uso de segmentos apicais em meio de cultura suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e cultivo em SVN1 ou SVN2. O cultivo de segmentos apicais em SVN1 e SVN2, sem a adição de sacarose favoreceu a produção de matéria seca das folhas. A adição de sacarose no meio de cultivo aumentou o acúmulo de flavonoides em 3,1 vezes. O SVN2 e SVN4 favoreceram o acúmulo de pigmentos fotossintéticos. A adição de sacarose no meio de cultivo promove o enraizamento, acúmulo de flavonoides e favorece a atividade antioxidante. A ausência de sacarose induz a produção de matéria seca das folhas. O uso do sistema de ventilação natural favorece o crescimento e a micropropagação da *U. dioica*. O acúmulo de compostos de atividade antioxidante é superior em plântulas cultivadas em sistema convencional.

**Palavras-chave:** Sacarose. Compostos fenólicos. Flavonoides. Micropropagação. Urtiga.

**CHAPTER 3 *In vitro* GROWTH AND ACCUMULATION OF ANTIOXIDANT  
COMPOUNDS IN *Urtica dioica* L. MICROPROPAGATED UNDER DIFFERENT  
NATURAL VENTILATION SYSTEMS**

**ABSTRACT**

*Urtica dioica* L. (Urticaceae) is a species rich in vitamins and minerals, known in folk medicine as being effective in treating the symptoms of arthritis, diabetes, rheumatism, and benign prostatic hyperplasia. According to recent studies, phenolic compounds and flavonoids may be responsible for its antioxidant activity. Therefore, this study aimed to evaluate the use of natural ventilation system in the growth and accumulation of secondary compounds in micropropagated *U. dioica* plantlets. Two types of explants (nodal and apical segments) with one pair of leaves were cultured in the absence and presence of sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) in four different culture systems: conventional culture system (without membranes) with one membrane (SVN1), two (SVN2) and four porous membranes (SVN4). After 40 days, growth, leaf area, dry matter, photosynthetic pigments, total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity were evaluated. The natural ventilation system was superior to the conventional one regarding the parameters of growth and dry matter production. The best results of micropropagation were observed with the use of apical segments in culture media supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and culture in SVN1 or SVN2. Cultivation of apical segments in SVN1 and SVN2, without the addition of sucrose, favored leaf dry matter production. The addition of sucrose in the culture medium increased the accumulation of flavonoids by 3.1 times. SVN2 and SVN4 favored the accumulation of photosynthetic pigments. The addition of sucrose in the culture medium promotes rooting, accumulation of flavonoids and enhance the antioxidant activity. The absence of sucrose induces leaf dry matter production. The use of natural ventilation system favors *U. dioica* growth and micropropagation. The accumulation of compounds of antioxidant activity is superior in plantlets grown in conventional system.

**Keywords:** Sucrose. Phenolic compounds. Flavonoids Micropropagation. Nettle.

## 1 INTRODUÇÃO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae) é considerada uma planta daninha de alto valor nutricional, popularmente conhecida no Brasil por causar reações alérgicas e dor ao entrar em contato com a pele (ADHIKARI; BAJRACHARYA; SHRESTHA, 2016; LIMA et al., 2008). Entretanto, a espécie apresenta alto valor nutricional e é utilizada na medicina popular no tratamento de artrite, anemia, reumatismo, paralisia muscular, diabetes, hiperplasia prostática benigna e úlcera (UPTON, 2013; CHRUBASIK et al., 1997).

A urtiga é produzida comercialmente como matéria-prima para a produção de fitoterápicos e para a fabricação sustentável de fibras na indústria têxtil, na produção de cordas e tecidos (BACCI et al., 2009). Em alguns países da Europa, existem programas de melhoramento e produção de clones de alto teor de fibras (DI VIRGILIO et al., 2015). Entretanto, a propagação seminífera da espécie resulta em plantas não homogêneas, em razão do alto nível de heterosigose (VOGL; HARTL, 2003), sendo indicada a propagação vegetativa da espécie para fins comerciais.

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetal, que permite a produção clonal de mudas livres de patógenos, em alta escala, sob condições ambientais controladas e, durante todo o ano, visando a obter plantas com maior produção de biomassa, rendimento e composição uniforme dos metabólitos secundários de interesse (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018). A técnica também permite estudar a influência do ambiente no crescimento *in vitro* e no acúmulo de compostos bioativos pelas plantas medicinais (DOU et al., 2017; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2016).

Plântulas micropropagadas geralmente necessitam de uma fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, pois o pouco CO<sub>2</sub> disponível não é suficiente para uma fotossíntese eficiente (KOZAI, 2010). Entretanto, pelas diferentes respostas morfofisiológicas das plantas à organogênese, um protocolo de micropropagação eficiente é específico para cada espécie, sendo necessário definir parâmetros como a concentração de sacarose, tipo de explante utilizado e melhores condições ambientais para promover as melhores condições de crescimento *in vitro* (ISAH, 2015).

Em razão da alta contaminação por microorganismos, os frascos utilizados na micropropagação são vedados, criando um microambiente com baixa concentração de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa, alta concentração de etileno e sem trocas gasosas com o ambiente externo (KOZAI; KUBOTA, 2001). Essas condições favorecem o aparecimento de anomalias

fisiológicas, como raízes malformadas, baixa concentração de clorofilas e hiperidricidade, fatores responsáveis por grandes perdas na fase de aclimatização das mudas (ISAH, 2015).

Em contrapartida, o sistema de ventilação natural permite trocas gasosas do recipiente com o exterior, ao passo que mantém um microambiente asséptico, através de membranas porosas, permitindo concentrações de CO<sub>2</sub> ideais, redução da umidade relativa, maior taxa fotossintética e maior sobrevivência na fase de aclimatização (MOREIRA et al., 2013; SALDANHA et al., 2012).

O uso das membranas influencia o crescimento e o metabolismo secundário das plantas medicinais (IAREMA et al. 2012; SILVA et al., 2017; SALDANHA et al., 2012). Entretanto, há uma carência de informações sobre a micropropagação da *Urtica dioica* e quanto ao uso do sistema de ventilação natural. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do uso do sistema de ventilação natural, tipo de explante e concentração de sacarose no crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante das plântulas de urtiga micropropagadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais e no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG), na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Como planta-matriz, uma planta de *Urtica dioica* L. pertencente ao Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foi utilizada. A matriz foi depositada no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG), em novembro de 2018, sob o registro 58577.

Explantos foram coletados e encaminhados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais para estabelecimento *in vitro*.

### 2.1 Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento consistiu de desinfestação em água corrente, por 30 minutos, seguido de imersão em álcool 70%, por 30 segundos, e por imersão em água sanitária com 1,25% de cloro ativo, por 15 minutos, sob agitação constante.

Posteriormente, os explantes foram padronizados em 1 cm e inoculados na vertical em tubos de ensaio, contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, por 20 min, a 121°C. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26±1 °C, sob lâmpadas fluorescentes (39 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e fotoperíodo de 16h. A cada 40 dias, as plantas foram repicadas até a obtenção de material necessário para a montagem dos experimentos.

### 2.2 Sistema de Ventilação Natural

Segmentos apicais e nodais (primeiro e segundo segmento nodal a partir do ápice da planta) com um par de folhas, provenientes de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, foram padronizados em aproximadamente 1 cm com auxílio de um bisturi e inoculados na vertical em frascos contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com ou sem sacarose (30 g L<sup>-1</sup>). O meio MS foi suplementado com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C. Em seguida, os frascos foram encaminhados para a sala de crescimento onde permaneceram por 40 dias sob lâmpadas LED,

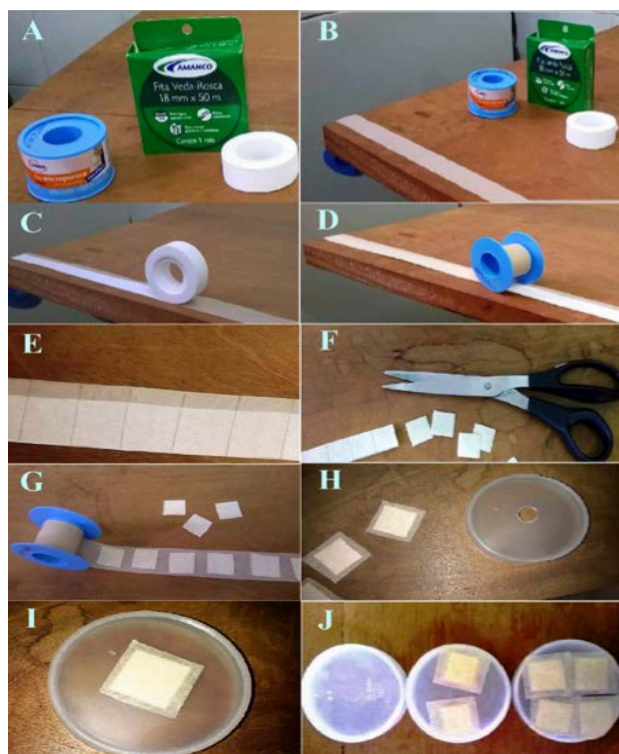


na intensidade de luz de  $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (definida no experimento de intensidade de luz), fotoperíodo de 16 h e à temperatura de  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial triplo, sendo 2 tipos de explantes (nodal e apical), 2 concentrações de sacarose (0 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e 4 sistemas de cultivo: convencional (SC); sistema de ventilação natural com uma (SVN1); duas (SVN2) e quatro membranas (SVN4), totalizando 16 tratamentos, sendo 4 repetições com 3 frascos por repetição e 4 plântulas por frasco.

As membranas porosas foram montadas de acordo com o trabalho de Saldanha et al. (2012) (FIGURA 1), utilizando fita microporosa bege (Cremer ®) e fita veda rosca da marca Amanco ® (FIGURA 1A). No total, a membrana consiste em quatro camadas, sendo a primeira de fita microporosa (FIGURA 1B), a segunda de fita veda rosca (FIGURA 1C), a terceira camada novamente de fita microporosa (FIGURA 1D). Essas três camadas foram cortadas em quadrados de  $1 \text{ cm}^2$  (FIGURA 1E-F) que foram distribuídos sobre uma outra camada de fita microporosa, totalizando 4 camadas (FIGURA 1G). Foram cortados quadrados de tamanho homogêneo e colados sobre furos de 1 cm de diâmetro, feitos nas tampas dos frascos. As tampas continham 0, 1, 2 e 4 furos (FIGURA 1H-J).

Figura 1 - Esquema de montagem das membranas porosas utilizadas na montagem do sistema de ventilação natural.



Fonte: Giulia Duarte. Lavras, 2016.

### 2.3 Análises do crescimento

O comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR) foi determinado medindo-se da base da brotação até o meristema apical e meristema da raiz, respectivamente. Os valores de matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC) e raiz (MSR) foram obtidos a partir da separação das respectivas partes, as quais foram acondicionadas em sacos de papel kraft e desidratadas em estufa de circulação de ar forçado, a 37°C, por 72h, e posterior pesagem em balança de precisão. Para a avaliação da área foliar, 5 plântulas representativas por tratamento foram utilizadas. Todas as folhas tiveram sua área foliar mensurada, Em razão da do software WinFOLIATM e scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO.

### 2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

Para análise dos pigmentos fotossintéticos, 50 mg de matéria fresca das folhas de cada tratamento foram coletados, em sala escura iluminada somente com luz verde. Utilizou-se somente o segundo par de folhas de cada plântula. O material foi colocado em tubos do tipo Falcon, envoltos em papel alumínio, e, em seguida, 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. Em seguida, os tubos foram encaminhados para a estufa, à temperatura de 65 °C, por 24h. Após esse período, 3 mL do conteúdo foram coletados e colocados em cubetas de quartzo, para leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 480 nm (carotenoides) 649 nm (clorofila *a*) e 665 nm (clorofila *b*) (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). As leituras foram realizadas na leitora de microplacas TECAN INFINITY M200 PRO, operada com o sistema de processamento de dados I-control ® versão 3.37. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

As concentrações de clorofila e carotenoides foram calculadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) e tiveram seus resultados expressos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca de tecido foliar (mg g<sup>-1</sup>),

$$\text{clorofila } a \text{ (Ca)} = [(12,47 \times A_{665,1}) - (3,62 \times A_{649,1})]$$

$$\text{clorofila } b \text{ (Cb)} = [(25,06 \times A_{649,1}) - (6,5 \times A_{665,1})]$$

$$\text{carotenoides} = (1000 A_{480} - 1,29 Ca - 53,78 Cb)/220$$

Onde, A<sub>665,1</sub>= absorvância mensurada a 665 nm; A<sub>649,1</sub>= absorvância mensurada a 649 nm; A<sub>480</sub>= absorvância mensurada a 480 nm.

## 2.5 Doseamento de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

Após as análises de crescimento, foi realizado o doseamento dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante foi avaliada por meio dos métodos DPPH, CAT e ORAC.

### 2.5.1 Preparação extrativa e condições gerais

Os extratos foram preparados a partir de folhas secas de *Urtica dioica*, pulverizadas em gral e pistilo. Uma alíquota de 15 mg do pó de *U. dioica* foi pesada diretamente em microtubos. Uma alíquota de 2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) foi adicionada aos tubos, os quais foram vortexados por 5 segundos e submetidos à extração por sonicação por 15 minutos, a temperatura ambiente, seguida por centrifugação a 10.000 RPM, por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer (-20 °C), até a realização das análises.

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas na leitora de microplacas TECAN INFINITY M200 PRO, operada com o sistema de processamento de dados I-control® versão 3.37. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

### 2.5.2 Fenóis Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita com base método de Folin-Ciocalteu, com modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Uma alíquota de 50 µL do extrato, 130 µL de solução etanólica de Folin-Ciocalteu (10%) e 130 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,0%) foram adicionados em microtubos de 2 mL. As amostras foram incubadas por 2 horas no escuro, à temperatura ambiente. Posteriormente, 300 µL foram adicionados em microplacas de 96 poços e a absorbância foi lida a 760 nm.

A curva de calibração foi constituída com padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich®, ≥ 98%) na faixa de 0,0078 a 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, gerando a equação  $y = 6,2873x + 0,9239$  ( $R^2 = 0,9986$ ). A partir da equação da reta, o acúmulo dos compostos fenólicos totais foi calculado, com resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de matéria seca de folha (mgEAG gMSF<sup>-1</sup>).

### 2.5.3 Flavonas/Flavonóis Totais

A quantificação de flavonoides foi baseada na metodologia de Atanassova, Georgieva e Ivancheva (2011). Em microtubos de 2 mL, 100  $\mu\text{L}$  da amostra foram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de água destilada e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$ . Posteriormente, os microtubos foram vortexados por 5 segundos e, após 5 minutos, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  foi adicionada aos tubos. Após 6 minutos, foi adicionada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  (1 M). Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  das amostras foram pipetados em microplacas de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 510 nm. Como controle, 100  $\mu\text{L}$  da amostra e 300  $\mu\text{L}$  de água destilada foram utilizados. Como branco, foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  da amostra, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  (1 M) e 200  $\mu\text{L}$  de água destilada.

A curva de calibração foi obtida, a partir do padrão quercetina (Sigma-Aldrich  $\geq 95\%$ ), diluído na faixa de 0,0625 a 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  ( $y=3,72x+0,2596$ ,  $R^2=0,9901$ ). O acúmulo de flavonoides teve seu resultado expresso em miligramas equivalente de quercetina por grama de matéria seca de folha ( $\text{mgEQ gMSF}^{-1}$ ).

### 2.5.4 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada, utilizando-se a metodologia de redução do molibdato (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), com modificações. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato de cada tratamento foi adicionada a 1 mL da solução reagente CAT (fosfato de sódio monobásico (28 mM), molibdato de amônio (4 mM) e ácido sulfúrico (0,6 M), em iguais proporções) em microtubos de 2 mL, os quais foram incubados a 95 °C por 90 minutos e, posteriormente, resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  das amostras foram pipetados em microplacas de 96 poços e a absorbância mensurada a 695 nm.

A CAT foi determinada, usando-se uma curva de calibração do padrão ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®,  $\geq 99,7\%$ ) nas concentrações de 0,002 a 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , na qual a equação da reta foi  $y= 6,80x +0,0716$  ( $R^2=0,9946$ ). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido ascórbico por grama de matéria seca de folha ( $\text{mgEAA gMSF}^{-1}$ ).

### 2.5.5 Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

Para determinar a atividade de eliminação de radicais livres, utilizou-se o método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazil), de acordo com a metodologia de

Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações, utilizando-se uma solução etanólica 92,8° GL de DPPH ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mantida em abrigo da luz e refrigeração.

Para cada amostra, foram empregadas as soluções extrativas originais ( $7,5 \text{ g mL}^{-1}$ ) e diluições sequenciais em MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 até 1/128. Em microplacas de 96 poços, alíquotas de  $250 \mu\text{L}$  da solução DPPH foram adicionadas a  $50 \mu\text{L}$  das amostras. As placas foram incubadas por 60 minutos no escuro, à temperatura ambiente e, em seguida, tiveram a absorbância lida a 517 nm. A porcentagem de eliminação do radical DPPH foi calculada a partir da fórmula:

$$\%AA = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100$$

Onde,  $A_0$ : absorbância da solução etanólica do DPPH;  $A_1$ : absorbância da solução DPPH + extrato. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa como  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a qual corresponde à concentração do extrato capaz de causar a inibição de 50% dos radicais DPPH.

### 2.5.6 Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

A Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio seguiu a metodologia de Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), com modificações. Em microplacas pretas de 96 poços, uma alíquota de  $25 \mu\text{L}$  da amostra foi adicionada a  $150 \mu\text{L}$  de fluoresceína ( $70 \text{ mM}$ ), preparada em tampão fosfato ( $75 \text{ mM}$  e pH 7,4). Posteriormente, a microplaca foi pré-incubada durante 10 minutos, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e, após esse período, foram adicionados  $30 \mu\text{L}$  do radical AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto] ( $12 \text{ mM}$ ). A fluorescência registrada a cada minuto, por 150 minutos. Como controle, o padrão Trolox nas concentrações de 0,25 a  $0,015625 \text{ mg mL}^{-1}$  foi utilizado. Como branco foram utilizados  $30 \mu\text{L}$  do tampão fosfato ( $75 \text{ mM}$  e pH 7,4) em substituição ao radical AAPH. Os resultados foram calculados utilizando-se uma equação de regressão entre a concentração de Trolox e a AUC (área sobre a curva) líquida ( $AUC_{\text{amostra}} - AUC_{\text{branco}}$ ). Os valores de ORAC foram expressos como mg de equivalente de Trolox por grama de matéria seca da folha ( $\text{mgET gMSF}^{-1}$ ).

## **2.6 Análises estatísticas**

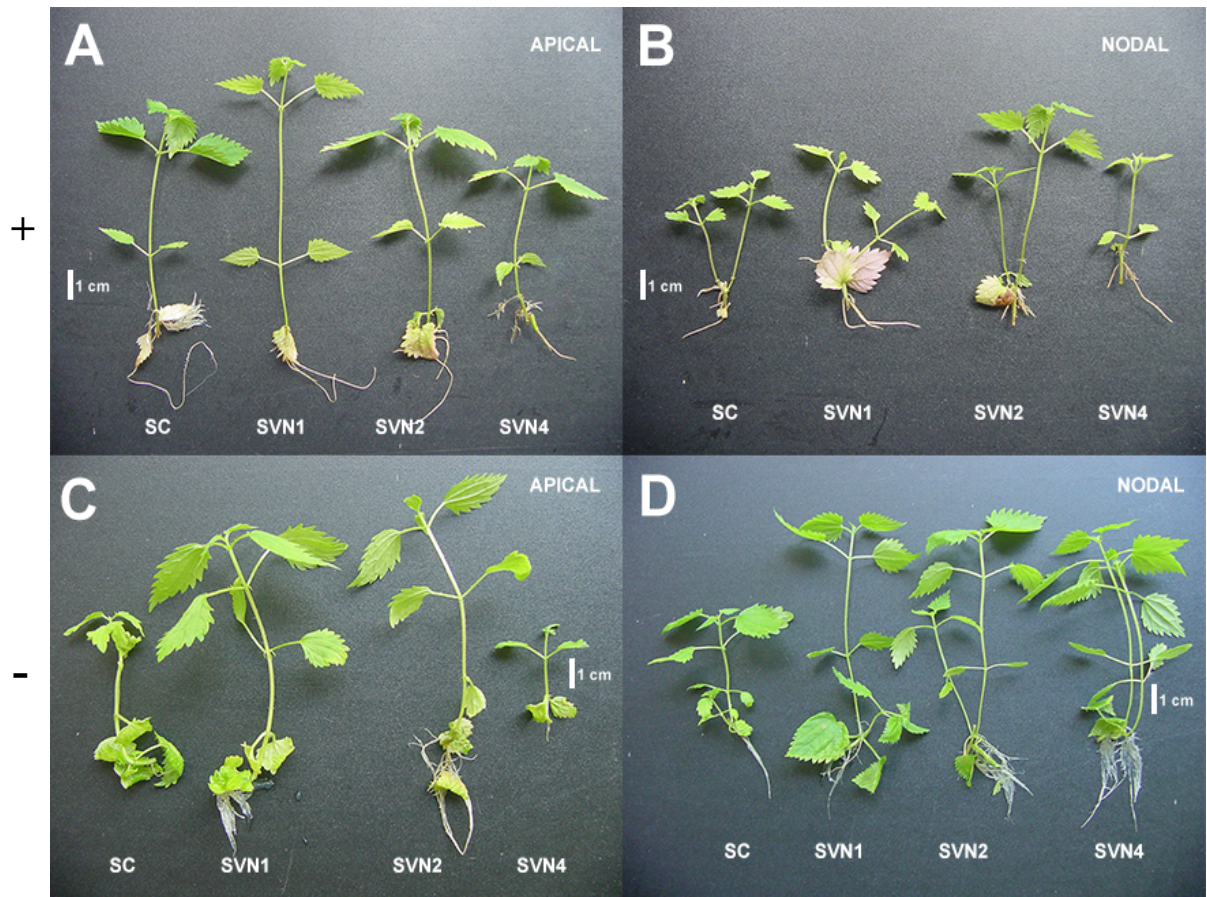
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software R Development Core Team (2012).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Crescimento *in vitro*

Os diferentes sistemas de cultivo, tipos de explante e concentrações de sacarose influenciaram, significativamente, o crescimento e produção de matéria seca de plântulas de *Urtica dioica* (FIGURA 2 e TABELA 1). Houve uma forte interação significativa entre os tipos de explante, sacarose e sistema de cultivo ( $p < 0,001$ ) (TABELA 2).

Figura 2 - Plântulas de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais e apicais em meio MS em diferentes sistemas de cultivo: convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro (SVN4) membranas, cultivadas por 40 dias. A e B: com sacarose; C e D: sem sacarose. Lavras, 2019.



Fonte: do autor (2019).

Plântulas cultivadas em frascos com tampas contendo uma (SVN1) e duas membranas (SVN2) apresentaram os melhores resultados para matéria seca das folhas, caule, raiz e total (FIGURA 2 e TABELA 1). O aumento da disponibilidade do CO<sub>2</sub>, em relação ao sistema

convencional (SC), favorece a produção de fotoassimilados e o acúmulo de biomassa (SALDANHA et al., 2012; SILVA et al., 2017). Os menores valores de crescimento e acúmulo de matéria seca em plântulas cultivadas foram observados no sistema convencional de cultivo *in vitro*. O uso do sistema convencional limita a fotossíntese, uma vez que não permite que a planta *in vitro* receba quantidades adequadas de CO<sub>2</sub> (XIAO; NIU; KOZAI et al., 2011). Resultados semelhantes foram reportados para a cultura do tomate (MILLS; TAL, 2004), *Cattleya walkeriana* (SILVA et al., 2014), *Plectranthus amboinicus* (SILVA et al., 2017), *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2012), *Lippia gracilis* Schauer (LAZZARINI et al., 2019) e *Azadirachta indica* (RODRIGUES et al., 2012).

O uso de quatro membranas (SVN4) foi estatisticamente igual ao uso do sistema convencional (SC) quanto à produção de matéria seca e crescimento *in vitro*. O SVN4 foi inferior ao SC somente em relação ao comprimento da parte aérea (CPA) (TABELA 1). Esses resultados podem estar aliados à evaporação do meio de cultura observada nos frascos com o uso do SVN4. Apesar das maiores concentrações de CO<sub>2</sub> nesse tratamento, a perda de água por evapotranspiração favoreceu o aumento da concentração de sais no meio de cultura restante no frasco, reduzindo o seu potencial hídrico, e dificultando a absorção de água e nutrientes pelas plântulas no SVN4.

Plântulas cultivadas no SVN2 apresentaram os melhores valores quanto ao enraizamento (TABELA 1). Assim, é possível que apresentem maior taxa de sobrevivência em uma futura fase de aclimatização. A resposta das plantas à fase de aclimatização está diretamente relacionada ao desenvolvimento das raízes (CHANDRA et al., 2010).

Plântulas cultivadas sem sacarose não diferiram estatisticamente das cultivadas em 30 g L<sup>-1</sup>, para as variáveis de crescimento, exceto para a matéria seca das folhas, visto que a sua ausência promoveu uma maior produção de MSF (TABELA 1). Entretanto, a adição da fonte exógena de carbono promoveu melhores resultados quanto à matéria seca do caule (4,78 mg gplanta<sup>-1</sup>) e raiz (2,01 mg gplanta<sup>-1</sup>).

A ausência de sacarose no meio de cultura leva a baixa produção de raízes em *Capsicum chinense* (BARRALES-LÓPEZ et al., 2015). A adição de sacarose no meio de cultura induz o enraizamento em plântulas de *Syzygium cumini* (JAIN; BABBAR, 2003) e *Arabidopsis thaliana* (MISHRA et al., 2009). A sacarose afeta a produção de fitohormônios e metabólitos secundários (MISHRA et al., 2009; YUAN; WYSOCKA-DILLERB, 2006). Entretanto, altas concentrações podem causar um acúmulo de carboidratos nas plântulas e a inibição da fotossíntese (HDIDER; DERSJARDINS, 1994).



De modo geral, plântulas provenientes de segmentos apicais foram semelhantes às de segmentos nodais, sendo superiores somente quanto à matéria seca de raiz (MSR), número de folhas (NF) e área foliar (AF) e inferiores quanto à matéria seca das folhas (MSF) (TABELA 1). O meristema apical é a fonte de produção de auxinas, fitohormônio promotor do crescimento de raízes (TAIZ et al., 2017). Assim, os segmentos apicais deram origem a plântulas de melhor enraizamento, que absorvem água, sais e sacarose do meio de cultura com mais eficiência, enquanto o maior número de folhas com maior área foliar intercepta a luz e promove uma maior produção de fotoassimilados. Como consequência, produzem-se mudas de melhor qualidade e favorece a fase de aclimatização.

### 3.2 Pigmentos fotossintéticos

Houve interação significativa entre segmentos, sacarose e sistema de ventilação para a clorofila *b*, clorofila total e carotenoides. Entretanto, para clorofila *a* não foi observada interação significativa (TABELA 3 e TABELA 4). Não houve diferença significativa entre os sistemas de cultivo quanto ao acúmulo de clorofila *a*, *b* e carotenoides (TABELA 3). Entretanto, o uso de duas (SVN2) e quatro membranas (SVN4) favoreceram a produção dos pigmentos fotossintéticos (clorofila total). Segundo Zobayed et al. (1999), o acúmulo de etileno nos recipientes de cultivo *in vitro* reduz a produção de clorofila nas plantas. Assim, com aumento das trocas gasosas obtido com o uso das membranas porosas, a concentração de etileno nos frascos provavelmente foi reduzida, favorecendo a síntese de clorofila total. De acordo com Saldanha et al. (2012), o uso das membranas pode estimular a fotossíntese ao manter uma concentração favorável de CO<sub>2</sub> nos recipientes de cultivo *in vitro*. Neste estudo, observou-se que o aumento do número de membranas foi diretamente proporcional ao conteúdo total de clorofila.

Não houve diferença significativa entre os tipos de segmentos utilizados. De modo geral, a adição de sacarose favoreceu a produção de clorofila *a* e carotenoides (TABELA 3). Entretanto, a adição da fonte exógena de carbono provocou a redução na concentração de clorofila total e clorofila *b* (TABELA 3). Resultados semelhantes foram observados por Węgrzynowicz-Lesiak et al. (2012), ao estudarem o efeito da sacarose na concentração de pigmentos fotossintéticos em tulipas.

Tabela 1 - Matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), total (MST), comprimento da parte aérea (CPA), raiz (CR), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Segmentos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Sistemas de cultivo	MSF mg gplanta <sup>-1</sup>	MSC mg gplanta <sup>-1</sup>	MSR mg gplanta <sup>-1</sup>	MST mg gplanta <sup>-1</sup>	CPA (cm)	CR (cm)	NF	AF (cm <sup>2</sup> )
Apical	30	SC	5,88 d	3,95 e	1,68 c	11,53 d	7,03 a	2,78 d	7,08 b	8,42 b
		SVN1	7,15 c	5,95 c	3,28 a	16,35 b	7,70 a	3,48 b	6,43 c	9,46 a
		SVN2	9,19 b	6,78 b	2,80 a	18,73 a	6,40 b	4,80 a	7,13 b	8,51 b
		SVN4	4,90 d	3,40 e	2,53 b	10,85 d	4,43 c	3,55 b	5,85 c	2,85 g
	0	SC	3,00 e	4,23 e	1,48 c	8,03 f	5,20 c	2,75 d	7,25 b	3,34 f
		SVN1	7,08 c	5,23 d	1,23 c	13,55 c	6,35 b	2,73 d	8,00 a	8,31 b
		SVN2	5,00 d	3,03 f	1,28 c	9,23 e	5,08 c	3,00 c	7,50 b	5,78 d
		SVN4	1,70 f	1,80 g	1,40 c	4,88 g	2,50 e	0,90 f	4,00 e	1,43 h
Nodal	30	SC	3,23 e	2,70 f	1,40 c	7,30 f	4,43 c	1,90 e	4,08 e	2,13 g
		SVN1	7,48 c	8,53 a	2,20 b	6,93 f	4,60 c	2,35 e	6,00 c	4,44 e
		SVN2	7,13 c	4,23 e	1,55 c	12,93 c	5,13 c	3,10 c	4,75 d	4,26 e
		SVN4	3,60 e	2,70 f	0,63 d	6,93 f	2,80 e	2,78 d	4,00 e	1,00 h
	0	SC	9,58 b	1,65 g	1,28 c	12,50 c	3,70 d	2,48 d	5,75 c	4,62 e
		SVN1	10,85 a	3,68 e	1,35 c	15,88 b	6,25 b	3,10 c	5,50 c	7,03 c
		SVN2	10,90 a	4,85 d	1,30 c	16,95 b	6,35 b	3,83 b	6,25 c	7,98 b
		SVN4	11,63 a	5,23 d	2,20 b	19,03 a	5,70 b	3,58 b	5,68 c	7,18 c
Média para segmentos										
Apical		5,48 b	4,29 a	1,96 a	11,64 a	5,58 a	3,00 a	6,65 a	6,01 a	
Nodal		8,05 a	4,19 a	1,49 b	13,71 a	4,87 a	2,89 a	5,25 b	4,83 b	
Média para sacarose										
30		6,06 b	4,78 a	2,01 a	12,85 a	5,31 a	3,09 a	5,66 a	5,13 a	
0		7,46 a	3,70 b	1,44 b	12,50 a	5,14 a	2,79 a	6,24 a	5,71 a	
Média para sistema de cultivo										
SC		5,42 b	3,13 c	1,46 a	9,84 b	5,09 b	2,48 b	6,04 a	4,63 b	
SVN1		8,14 a	5,84 a	2,01 a	15,99 a	6,23 a	2,91 b	6,48 a	7,31 a	
SVN2		8,03 a	4,71 a	1,73 a	14,45 a	5,74 a	3,68 a	6,41 a	6,63 a	
SVN4		5,47 b	3,28 b	1,69 a	10,41 b	3,86 c	2,70 b	4,88 b	3,11 b	

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto a matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), total (MST), comprimento da parte aérea (CPA), raiz (CR), número de folhas (NF) e área foliar (AF) de plântulas de *Urtica dioica* L. cultivadas *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Fontes de Variação	MSF	MSC	MSR	MST	CPA	CR	NF	NB	AF
Segmento x Sacarose x Sistema de cultivo	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Segmento x Sacarose	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Segmento x Sistema de cultivo	***	***	ns	***	***	***	***	**	***
Sacarose x Sistema de cultivo	***	***	***	***	***	***	**	**	***
Segmento	***	ns	***	***	***	ns	***	***	***
Sacarose	***	***	***	*	ns	**	***	***	***
Sistema de cultivo	***	***	**	***	***	***	***	***	***

Significância: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns- não significativo.

Tabela 3 - Pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Urtica dioica* oriundas nodais e apicais cultivados *in vitro* sob diferentes sistemas concentrações de sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Segmento	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Sistema de cultivo	Clorofila	Clorofila	Clorofila
			<i>a</i>	<i>b</i>	Total
			(mg g <sup>-1</sup> )		
Apical	30	SC	0,89 b	0,26 f	1,15 c
		SVN1	0,67 d	0,30 f	0,97 d
		SVN2	1,12 a	0,33 f	1,44 b
		SVN4	0,57 d	0,54 e	1,12 d
	0	SC	0,12 f	0,86 d	0,98 d
		SVN1	0,13 f	1,23 b	1,37 b
		SVN2	0,15 f	1,34 b	1,21 c
		SVN4	0,33 e	2,53 a	2,86 a
Nodal	30	SC	0,78 c	0,21 f	0,99 d
		SVN1	0,58 d	0,24 f	0,82 d
		SVN2	0,98 b	0,27 f	1,25 c
		SVN4	0,43 e	0,42 f	0,86 d
	0	SC	0,14 f	0,79 d	0,92 d
		SVN1	0,12 f	0,98 c	1,10 d
		SVN2	0,18 f	1,06 c	1,52 b
		SVN4	0,14 f	1,11 c	1,25 c
Média para explante					
Apical			0,50 a	0,92 a	1,39 a
Nodal			0,42 a	0,63 a	1,09 a
Média para sacarose					
30			0,75 a	0,32 b	1,07 a
0			0,16 b	1,24 a	1,40 a
Média para sistema ventilação					
SC			0,48 a	0,53 a	1,01 b
SVN1			0,37 a	0,69 a	1,06 b
SVN2			0,61 a	0,75 a	1,36 a
SVN4			0,37 a	1,15 a	1,52 a

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de S nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto a concentração de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Urtica dioica* L. cultivadas *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Fontes de Variação	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Carotenoide
Segmentos x Sacarose x Sistema de cultivo	ns	***	*	***
Segmentos x Sacarose	**	***	**	**
Segmentos x Sistema de cultivo	ns	***	***	***
Sacarose x Sistema de cultivo	***	***	**	***
Segmentos	***	***	ns	***
Sacarose	***	***	***	***
Sistema de cultivo	***	***	***	***

Significância: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns- não significativo.

### 3.3 Compostos fenólicos e atividades antioxidantes

Não houve interação significativa entre os segmentos utilizados, concentração de sacarose e sistema de cultivo quanto ao acúmulo de compostos fenólicos e atividades antioxidantes pelos métodos capacidade antioxidante total (CAT) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC). A interação dos fatores quanto ao acúmulo de flavonoides e atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH foi altamente significativa ( $p < 0,001$ ) (TABELA 5).

O uso dos segmentos apicais e uso do sistema de cultivo convencional (SC) e com uma membrana (SVN1) proporcionaram valores superiores de compostos fenólicos totais (CFT) (TABELA 6). A adição de sacarose no meio de cultivo não influenciou o acúmulo dos CFT nas plântulas.

Os menores valores de CFT foram observados nos tratamentos SVN2 e SVN4. Entretanto, no SVN2, as plântulas apresentaram os melhores resultados quanto ao crescimento (TABELA 1). Assim, pode-se inferir que esse baixo valor de CFT foi observado, uma vez que, em condições ideais de cultivo, as plantas tendem a deslocar seus fotoassimilados para a produção vegetativa, por não precisar investir na produção de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, para a sua proteção contra estresses ambientais. Resultados semelhantes foram observados por Son et al. (2012) ao estudarem a cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) onde os tratamentos de maior crescimento apresentaram valores inferiores quanto ao acúmulo de compostos fenólicos.

Tabela 5 - Interação entre os tipos de segmentos utilizados, concentrações de sacarose e sistemas de cultivo quanto aos compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides (F), Capacidade Antioxidante Total (CAT), DPPH e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) dos extratos de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2019.

Fontes de Variação	CFT	F	CAT	DPPH	ORAC
Segmentos x Sacarose x Sistema de cultivo	ns	***	ns	***	ns
Segmentos x Sacarose	***	***	**	***	**
Segmentos x Sistema de cultivo	ns	**	**	***	ns
Sacarose x Sistema de cultivo	ns	***	**	***	ns
Segmentos	***	***	ns	**	ns
Sacarose	ns	***	ns	***	ns
Sistema de cultivo	***	***	***	***	ns

Significância: \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns- não significativo.

Não houve diferença significativa quanto ao sistema de cultivo e segmento utilizado quanto aos flavonoides na *U. dioica* cultivada *in vitro* (TABELA 6). A adição de  $30 \text{ g L}^{-1}$  no meio de cultivo aumentou em 3,2 vezes o acúmulo de flavonoides.

De acordo com Qian et al. (2018), a sacarose regula os genes que controlam a biossíntese de flavonoides, em *Camelia sinensis* L. Solfaneli et al. (2006) reportaram que, em *Arabidopsis thaliana*, os genes responsáveis pela biossíntese de flavonoides respondem aos sinais da sacarose em si e não ao estresse osmótico causado pela sua adição no meio de cultura. A sacarose é utilizada pela planta como fonte de esqueletos de carbono e na indução de sinais que disparam processos metabólicos para a biossíntese de flavonoides (QIAN et al., 2018; LIU et al., 2014).

Somente os resultados obtidos pelo método CAT apresentaram diferenças significativas entre os sistemas de cultivo. O sistema convencional (SC) foi superior aos tratamentos com sistemas de ventilação natural. O sistema SVN1 apresentou os menores resultados quanto à atividade antioxidante (TABELA 6).

Não houve diferença significativa quanto ao tipo de explante (apical e nodal) na atividade antioxidante avaliada nos métodos CAT, DPPH e ORAC (TABELA 6). Somente o método DPPH detectou diferença significativa entre os tratamentos com adição de sacarose. Esse resultado pode ser observado, uma vez que cada método de avaliação de antioxidantes ocorre de uma forma diferente: a CAT é medida, via teste do fosfomolibdênio, baseado na redução do  $\text{Mo}^{6+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$  pelos compostos antioxidantes (KHAN et al., 2012). O teste ORAC avalia a capacidade antioxidante do extrato da planta, ao impedir a oxidação da fluoresceína, ocasionada por radicais peroxila (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

O método DPPH avalia a capacidade de um extrato de inibir o radical DPPH, uma vez que esse trata de um radical livre com elétron desemparelhado em um dos seus átomos de Nitrogênio (OLIVEIRA, 2015). Valores menores de IC<sub>50</sub> no ensaio de DPPH indicam maior atividade antioxidante. Dessa forma, a adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose favoreceu o acúmulo de substâncias antioxidantes.

Foi possível observar que a sacarose favoreceu o maior acúmulo de flavonoides e também a maior atividade antioxidante. Assim, pode-se inferir que os flavonoides são responsáveis pela atividade antioxidante da *Urtica dioica*. Os principais compostos bioativos presentes na urtiga são os compostos fenólicos quercetina, rutina, isoquercitrina e o ácido 5-O-cafeoilquínico (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016; ORČIĆ et al., 2014).

Tabela 6 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, oriundas de segmentos nodais e apicais sob diferentes sistemas de cultivo e sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019.

(Continua)

Explante	Sacarose (g mL <sup>-1</sup> )	Sistema de cultivo	CFT	FT	CAT	DPPH	ORAC
Apical	30	SC	6,30 a	11,61 a	3,00 e	246,62 a	284,40 a
		SVN1	5,80 a	10,45 a	2,53 f	242,63 a	510,73 b
		SVN2	5,50 b	10,97 a	2,83 e	292,91 c	164,20 a
		SVN4	5,73 a	11,18 a	2,90 e	301,90 c	164,93 a
	0	SC	6,10 a	3,91 e	3,56 c	442,93 e	176,03 a
		SVN1	5,81 a	3,11 e	2,36 g	749,57 i	165,33 a
		SVN2	5,83 a	3,40 e	3,87 b	380,80 d	163,20 a
		SVN4	5,73 a	2,30 f	3,93 b	492,77 f	93,60 a
Nodal	30	SC	5,37 b	10,60 a	4,13 b	272,97 b	167,83 a
		SVN1	5,20 b	7,17 c	3,13 d	266,66 b	188,60 a
		SVN2	1,96 d	8,42 b	3,30 d	275,23 b	168,17 a
		SVN4	2,86 c	8,68 b	3,31 d	242,57 a	145,17 a
	0	SC	5,07 b	3,96 e	4,73 a	533,40 g	184,50 a
		SVN1	5,20 b	5,20 d	2,20 g	596,73 f	168,80 a
		SVN2	1,67 d	1,90 f	2,70 f	604,43 h	433,43 b
		SVN4	2,53 c	1,59 f	3,30 d	504,93 f	142,47 a
Média para segmento							
Apical			5,85 a	7,18 a	3,13 a	393,76 a	201,71 a
Nodal			3,73 b	5,77 a	3,34 a	399,79 a	199,87 a
Média para sacarose							
30			4,84 a	9,88 a	3,14 a	267,67 a	218,68 a
0			4,74 a	3,06 b	3,32 a	525,88 b	182,90 a

Tabela 6 - Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, oriundas de segmentos nodais e apicais sob diferentes sistemas de cultivo e sacarose, aos 40 dias. Lavras, 2019.

(Conclusão)

Explante	Sacarose (g mL <sup>-1</sup> )	Sistema de cultivo	CFT	FT	CAT	DPPH	ORAC
Média para sistema de cultivo							
SC			5,70 a	7,56 a	3,85 a	373,98 a	220,88 a
SVN1			5,50 a	6,23 a	2,56 c	465,82 a	238,27 a
SVN2			3,74 b	6,09 a	3,18 b	361,78 a	230,34 a
SVN4			4,22 b	6,00 a	3,33 b	385,54 a	113,67 a

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. Legenda: CFT: expresso em mg equivalentes de ácido gálico/g de folha seca (mg EAG gMSF<sup>-1</sup>); CF: expresso em mg equivalentes de quercetina/g de folha seca (mg EQ gMSF<sup>-1</sup>); DPPH: captura de radicais livres de DPPH, expresso em IC<sub>50</sub>; CAT: capacidade antioxidante total expressa em mg equivalentes de ácido ascórbico/g de folha seca (mg EAA gMSF<sup>-1</sup>); ORAC: capacidade de absorção do radical oxigênio em mg equivalente de Trolox/g de folha seca (mg ET gMSF<sup>-1</sup>).



#### 4 CONCLUSÃO

O sistema de ventilação natural é superior ao convencional quanto aos parâmetros de crescimento e produção de matéria seca em plântulas de *Urtica dioica*. A adição de sacarose no meio de cultivo promove o enraizamento, aumenta o acúmulo de flavonoides e favorece a atividade antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, B. M.; BAJRACHARYA, A.; SHRESTHA, A. K. Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 119-124, 2016.
- ATANASSOVA, M.; GEORGIEVA, S.; IVANCHEVA, K. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 46, n. 1, p. 81-88, 2011.
- BACCI, L.; BARONTI, S.; PREDIERI, S.; DI VIRGILIO, N. Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 480-484, 2009.
- BARRALES-LÓPEZ, A.; ROBLEDO-PAZ, A.; TREJO, C.; ESPITIA-RANGEL, E.; RODRÍGUEZ-DE LAO, J. L. Improved in vitro rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 3, p. 274-283, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- CHRUBASIK, S.; ENDERLEIN, W.; BAUER, R.; GRABNER, W. Evidence for anti-rheumatic effectiveness of herba *Urtica dioica* in acute arthritis: a pilot study. **Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 105-108, 1997.
- DI VIRGILIO, N.; PAPAZOGLU, E. G.; JANKAUSKIENE, Z.; DI LONARDO, S.; PRACZYK, M.; WIELGUSZ, K. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. **Industrial Crop and Products**, v. 68, n. 1, p. 42-49, 2015.
- DOU, H.; NIU, G.; GU, M.; MASABNI, J. Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. **Horticulturae**, v. 3, n. 36, p. 1-11, 2017.
- ESPINOSA-LEAL, C. A.; PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1-18, 2018.
- HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 1, p. 27-33, 1994.

- HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.
- IAREMA, L.; DA CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Organ and Tissue Culture**, v. 110, n. 1, p. 227-238, 2012.
- ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 57, n. 2, p. 9-28, 2015.
- JAIN, N.; BABBAR, S. B. Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl explants of *Syzygium cuminii*. **Biologia plantarum**, v. 47, n. 1, p. 133-136, 2003.
- JAN, K.N.; ZARAFSHAN, K.; SINGH, S. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 2, p. 423-433, 2016.
- KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S.; AHMED, M. Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens*. **Chemical Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 43-54, 2012.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 1, p. 188-204, 2010.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001.
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. P. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 1, p. 33-43, 2019.
- LIMA, N. G. P.; CABRAL, A. G.; FURTADO, F. F.; LIMA, I.; MACEDO, R. O. *Urtica dioica*: uma revisão dos estudos das suas propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, n. 3, p. 199-206, 2008.
- LIU, Y.; WANG, Z.; SUN, M.; WANG, Y.; GAO, L.; XIA, T. Effect of sucrose on catechins biosynthesis in *Camellia sinensis* (L.). **Anhui Agricultural University**, v. 41, n. 5, p.743-750, 2014.
- MILLS, D.; TAL, M. The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 78, n. 3, p. 209-216, 2004.
- MISHRA, B. S.; SINGH, M.; AGRAWAL, P.; LAXMI, A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. **PLoS One**, v. 4, n. 2, e4502, 2009.
- MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B. D.; SANTOS, A.; REIS, C. O. D.; LANDGRAF, P. R. C.

*Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 1, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

ORČIĆ, D.; FRANCIŠKOVIĆ, M.; BEKVALAC, K.; SVIRČEV, E.; BEARA, I.; LESJAK, M.; MIMICA-DUKIĆ, N. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 48-53, 2014.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor-molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QIAN, Y.; ZHANG, S.; YAO, S.; XIA, J.; LI, Y.; DAI, X.; GAO, L. Effects of *in vitro* sucrose on quality components of tea plants (*Camellia sinensis*) based on transcriptomic and metabolic analysis. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 121-141, 2018.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BAUTISTA-AGUILAR, J. R. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2017.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; DE AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; DO RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. Low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. Crescimento *in vitro* e anatomia foliar de *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) cultivada em sistema de ventilação natural. **Revista Ceres [online]**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 1, p. 144-158, 1965.

SOLFANELLI, C.; POGGI, A.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 637-646, 2006.

SON, K. H.; PARK, J. H.; KIM, D.; OH, M. M. Leaf shape index, growth, and phytochemicals in two leaf lettuce cultivars grown under monochromatic light-emitting diodes. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 664-672, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal 6ª ed.** Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 858p.

UPTON R. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): extraordinary vegetable medicine. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-38, 2013.

VOGL, C. R.; HARTL, A. Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: A review. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 18, n. 3, 2003.

WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, E.; SANIEWSKI, M.; GÓRAJ, J.; HORBOWICZ, M.; MIYAMOTO, K.; UEDA, J. Effects of sugars on the growth and chlorophyll content in excised tulip stem in the presence of indole-3-acetic acid. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 20, n. 1, p. 97-114, 2012.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p.149-158, 2011.

YUAN, K.; WYSOCKA-DILLER, J. Phytohormone signalling pathways interact with sugars during seed germination and seedling development. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3359-3367, 2006.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective through flow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, n. 2, p. 113-123, 1999.