



CAMILA KNOPP DE SOUZA

**CONCENTRAÇÕES DE SAIS AFETAM O
CRESCIMENTO, FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE *Urtica dioica* L. *IN VITRO***

**LAVRAS-MG
2020**

CAMILA KNOPP DE SOUZA

**CONCENTRAÇÕES DE SAIS AFETAM O CRESCIMENTO, FENÓIS TOTAIS
E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Urtica dioica* L. *IN VITRO***

Monografia apresentada ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer aos meus pais, Andréa Knopp e Jose de Alencar Fontoura, por desde sempre acreditarem e investirem na minha educação e no meu aprendizado, por me apoiarem durante toda a graduação e fazer de tudo para me ajudar.

Agradecer também a toda a minha família além dos meus pais, que de alguma forma me ofereceram suporte para continuar os estudos e nunca desistir. Em especial ao meu avô Vanir Knopp, que se fez presente durante todo esse período e que me inspira a ser um profissional melhor a cada dia, obrigada por ter sido meu segundo pai e me dado todo esse apoio. Aos meus irmãos, Felipe Alencar e Ana Luiza, por acreditarem em mim e me apoiarem de tantas formas durante esse tempo, sem vocês eu tenho certeza que não teria conseguido aguentar tudo o que passei, não foram anos fáceis, mas sou muito grata por contar com a união e o apoio de vocês.

A todos os meus amigos feitos durante a graduação, com certeza teria sido muito mais difícil esse caminho sem a ajuda e companhia de vocês. Obrigada por estarem presente nos momentos mais difíceis e alegres da minha graduação.

Em especial aos meus amigos José Matheus, Tatiana e Rafaella por estarem sempre ao meu lado. Obrigada pelo carinho e paciência que tiveram comigo durante todo esse tempo e por me ajudarem demais a chegar até aqui sem desistir, vou levar pra sempre vocês com muito carinho no meu coração.

Aos professores da Universidade Federal de Lavras que passaram tanto conhecimento e aprendizado a mim, vocês são essenciais neste percurso. Gostaria de agradecer também em especial ao meu orientador José Eduardo, pela oportunidade de desenvolver trabalhos em conjunto, a professora Michele de floricultura por toda a ajuda e ensinamentos durante meu período no NEPAFLOR e a minha coorientadora Adriane Duarte, por me acompanhar e me ensinar tanto sobre a área da pesquisa, sem você esse trabalho não seria possível.

Agradecer ao Núcleo de Estudos em Paisagismo e Floricultura da UFLA. Núcleo esse onde eu pude acumular tanto aprendizado e desenvolver um carinho especial, onde tive a oportunidade de ter uma nova família dentro da universidade.

E por fim, também demonstrar a minha gratidão aos órgãos de apoio a pesquisa CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFLA pelas oportunidades de bolsas e projetos de iniciação científica desenvolvidos.

RESUMO

A *Urtica dioica* L., comumente chamada de urtiga, tem sido aplicada no alívio das dores e tratamento da artrite reumatoide, devido à sua ação anti-inflamatória. A cultura de tecidos permite a multiplicação em massa de plantas medicinais e visa produzir mudas livres de patógenos e doenças. Entretanto, alguns fatores, como a concentração de sais no meio de cultivo, podem influenciar no crescimento e na atividade antioxidante da espécie *in vitro*. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a influência do crescimento, concentração de fenóis totais e atividade antioxidante *in vitro* com diferentes concentrações de sais do meio básico do MS. Explantes nodais (1,0 cm) de plântulas *in vitro* foram inoculados em tubos de ensaio com 12,5 mL de meio de cultivo MS com 4 diferentes concentrações de sais: ¼ MS, ½ MS, MS e 2MS, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,7 e depois autoclavados. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sob 5 lâmpadas de LED com 94 µmol m⁻² s⁻¹ e a 26±1°C, por 40 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo 4 tratamentos e 5 repetições, com 5 tubos de ensaio por repetição e 1 explante por tubo. Avaliou-se o número de folhas, segmentos nodais e brotações, comprimento da parte aérea e da raiz, área foliar, massa seca da raiz, do caule, das folhas, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenóides, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante. Observou-se o maior comprimento da parte aérea (7,98 cm), número de folhas (7,5), maior número de segmentos nodais (3,8), maior área foliar (3,9 cm²), maior acúmulo de matéria seca total (14 mg plântula⁻¹) e maior concentração de clorofila *a* (1,03 mg g⁻¹) em plântulas cultivadas em meio de cultivo na concentração original de sais MS. O dobro da concentração de sais foi tóxico para a plântula e favoreceu o acúmulo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Desta forma, é indicado o uso da concentração original de sais MS para melhores resultados de crescimento *in vitro* e o dobro da concentração de sais (2MS) para o acúmulo de compostos fenólicos e atividade antioxidante na urtiga.

Palavras-chave: Urtiga. Cultura de tecidos. Planta medicinal.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	6
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1.	<i>Urtica dioica</i> L.	7
2.2.	Cultura de tecidos de plantas medicinais.....	9
2.3.	Atividade antioxidante da <i>Urtica dioica</i>	12
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1.	Local de condução e obtenção do material vegetal	14
3.2.	Descrição dos tratamentos	14
3.3.	Análise de crescimento	15
3.4.	Análise dos pigmentos fotossintetizantes	15
3.5.	Fenóis totais.....	16
3.6.	Análise de antioxidante pela Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)	16
3.7.	Análises estatísticas	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1.	Análise de crescimento.....	18
4.2.	Análise de pigmentos fotossintéticos	20
4.3.	Compostos fenólicos totais e atividades antioxidante	21
5.	CONCLUSÃO.....	23
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae) tem sido utilizada há centenas de anos na medicina popular no tratamento de algumas doenças como artrite, reumatismo, paralisia muscular e diabetes mellitus (UPTON, 2013). Suas folhas são a principal fonte de compostos bioativos e servem como matéria-prima na produção de extratos usados para produção de alimentos funcionais com maior teor antioxidante, fabricação de queijos e empregado nos setores de avicultura e piscicultura no preparo de rações (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015; DE VICO et al. 2018; DI VIRGILIO et al., 2015; VAN HAI, 2015).

A espécie também é empregada em outros setores comerciais, como no setor têxtil para produção de fibras sustentáveis para confecção de cordas, tecidos e redes de pesca (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012).

Na produção comercial da espécie, a propagação vegetativa tem grande potencial para o cultivo de mudas pois a propagação seminífera da espécie resulta em plantas não homogêneas, em razão do alto nível de heterosigose. Uma forma de realizar a produção dessas mudas com alto padrão de qualidade é através da cultura de tecidos, mais especificamente, através da técnica de micropropagação, que tem como finalidade a produção de clones com alta qualidade e mudas livres de patógenos e doenças (VOGL; HARTL, 2003).

Uma das dificuldades existentes na micropropagação é que um protocolo eficiente para a produção das mudas é específico para cada espécie, em razão a diferentes respostas fisiológicas e morfológicas de cada planta ao meio de cultura (ISAH, 2015). No caso da *Urtica dioica* L. não há um protocolo eficiente de micropropagação até o momento. Um dos fatores que podem influenciar de forma direta nesse protocolo é a composição do meio de cultura em que a plântula vai se desenvolver. O meio de cultura MS, foi desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962 e é um meio universalmente usado para a micropropagação. Esse meio é constituído por macronutrientes, micronutrientes, compostos orgânicos e vitaminas (QUISEN et al., 2008).

O meio de cultura e forma de propagação da urtiga podem influenciar no crescimento e concentração dos metabólitos secundários e, como os compostos fenólicos, conhecidos por apresentarem atividade antioxidante na espécie (DISOTTO et al., 2015). Estes compostos agem no sequestro de radicais livres produzidos no metabolismo e são utilizados na prevenção de doenças ligadas ao estresse oxidativo como distúrbios inflamatórios, câncer e diabetes (PISOSCHI; POP, 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de sais em meio de cultura MS no crescimento e no acúmulo de compostos fenólicos, assim como avaliar a atividade antioxidante em plântulas de *Urtica dioica* micropropagadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Urtica dioica* L.

A *Urtica dioica* L. é pertencente à família Urticaceae que compreende cerca de 53 gêneros e aproximadamente 2655 espécies (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016), podendo ser plantas monóicas e dióicas distribuídas por diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo (KAVALALI, 2003). Dentre os 53 gêneros existentes, no Brasil se encontram 13 deles espalhados por todo o território nacional, como por exemplo a *Urtica* e *Laportea*, chegando a 109 espécies com diferentes características e hábitos. As espécies conhecidas do gênero *Urtica* são *Urtica circularis* (Hicken) Sorarú, *Urtica spathulata* Sm., *Urtica urens* L. e *Urtica dioica* L. (ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI, 2015).

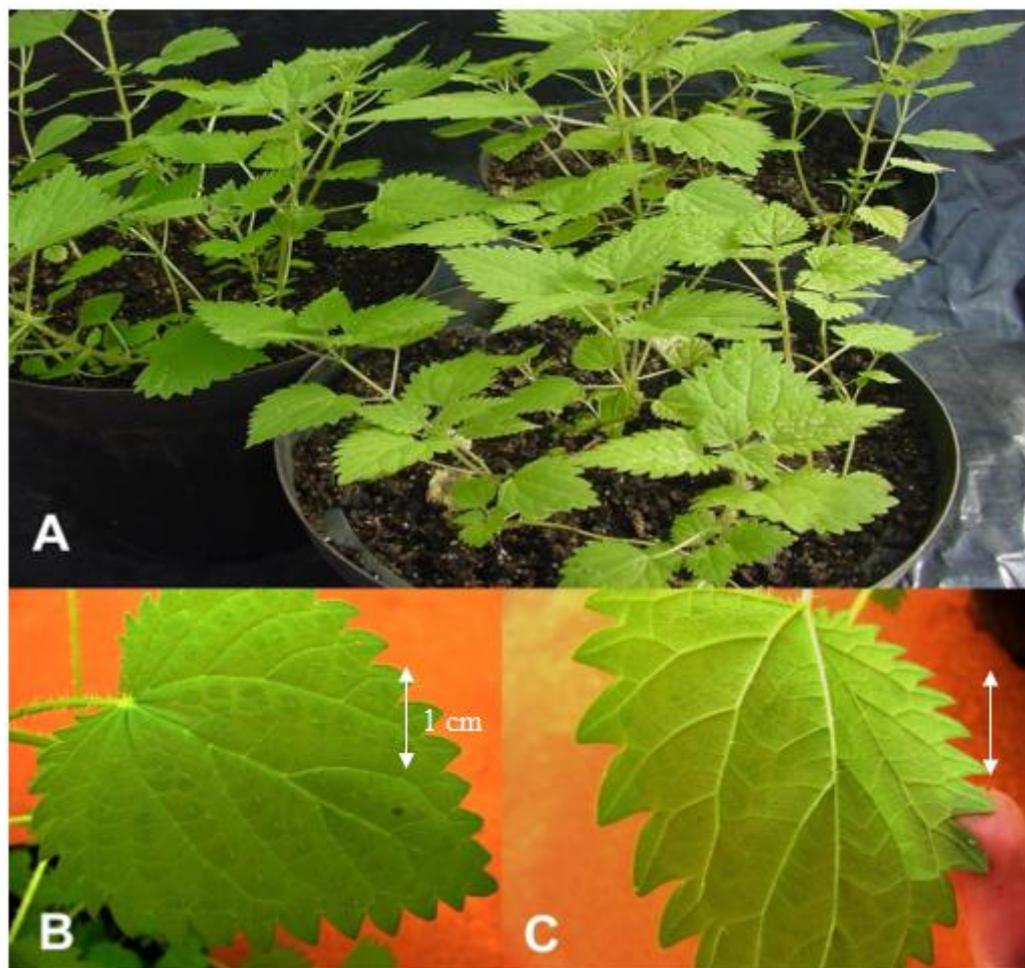
A *Urtica dioica* L. conhecida popularmente como urtiga, possui caule simples de coloração esverdeada e dispõe de poucas ramificações. A espécie apresenta folhas ovais ou lanceoladas e opostas, sendo seu caule e folhas cobertos por tricomas (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012; TAYLOR, 2009). É uma espécie perene herbácea que pode atingir até 2 m de altura (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016). Sua inflorescência se caracteriza pela formação de cachos (rácimio) de 2 a 8 cm chamado de panícula, com flores unissexuais e de coloração esverdeada (UPTON, 2013). Seus frutos são do tipo aquênio, possuem apenas uma semente e medem cerca de 0,7 a 0,9 mm de largura e 1 a 1,5 mm de comprimento (REAUME, 2010).

A espécie é utilizada há centenas de anos na medicina popular, sendo as folhas a principal fonte de compostos bioativos, serve como matéria-prima na produção de extratos usados para diversos fins (DI VIRGILIO et al., 2015). Algumas partes da planta como folhas, caule e flores são usados em decocção ou infusão para o tratamento de anemia, reumatismo, artrite, problemas musculares, diabetes, entre outras doenças. Pode ser empregada também no tratamento de “urticação” para estimular a circulação sanguínea (UPTON, 2013). Do ponto de vista nutricional, a *U. dioica* contém vitamina A, C, cálcio, ferro, sódios e ácidos graxos (RUTTO et al., 2013).

O desenvolvimento dessa espécie se dá melhor em solos ricos em nitrogênio, fosfato e matéria orgânica (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012), podendo ter o pH variando entre 5,6 a

7,6 (DI VIRGILIO et al., 2015). A urtiga é naturalmente propagada através de sementes e rizomas (JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016), e é classificada como espécie anemocórica (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).

Para a produção comercial da espécie, a propagação vegetativa tem grande potencial para o cultivo de mudas, via estaquia (VOGL; HARTL, 2003) ou rizomas (JANKAUSKIENE; GRUZDEVIENÉ, 2013; WURL et al., 2002), visando a produção uniforme de mudas com alto teor de fibras e matéria prima para produção de fitoterápicos. A urtiga apresenta elevado nível de heterozigose, assim, a propagação sexuada tem como resultado plantas não homogêneas (VOGL; HARTL, 2003).

Algumas aplicações dessa espécie na indústria incluem o setor alimentício, que utiliza seu extrato para produzir alimentos funcionais com maiores taxas de teor antioxidante

(BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015), ou ainda pode ser usado para a fabricação de queijos, auxiliando na coagulação do leite e alterando as propriedades organolépticas (FIOL et al., 2016). É empregada também nos setores de avicultura e psicultura, por apresentar atividade imunostimulante e promover o crescimento em peixes (DE VICO; GUIDA; CARELLA, 2018; VAN HAI, 2015) e induzir o aumento da resistência a doenças em aves (ŞANDRU et al., 2016). Outro setor da indústria a explorar o uso da urtiga é o setor têxtil para produzir fibras sustentáveis na confecção de cordas, tecidos e redes de pesca (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012).

As plantas produzem micromoléculas de grande variação estrutural como produto do metabolismo secundário em resposta às alterações ambientais para sobrevivência ou adaptação (TAIZ et al., 2017). Alguns fatores afetam diretamente o acúmulo dos compostos bioativos e metabolismo secundário da planta, como condições ambientais, hora do dia, idade da planta, danos mecânicos, disponibilidade de CO₂ e O₂, nutrientes disponíveis e sazonalidade (GOBBONETO; LOPES, 2007; NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

Dentre os metabolismos secundários estão 3 grandes grupos: terpenos e esteroides, alcaloides e os compostos fenólicos (AHMED; ARSHAD; KHAN, 2017). Esses compostos bioativos são usados pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos fitoterápicos, por possuírem ação antibiótica, anti-inflamatória e antioxidante (ČANADANOVIĆ-BRUNET et al., 2009). Dentre estes compostos, os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante (AO et al., 2008; KARIMI et al., 2013), e foram indicados como responsáveis pela atividade terapêutica da *Urtica dioica* (JAN; ZARAFSHAN; SING, 2016). Estes antioxidantes são responsáveis por prevenir o aparecimento de câncer, retardar o desenvolvimento de doenças crônicas e aumentar o tempo de prateleira de alguns alimentos (OSKOUÉIAN et al., 2011).

Há estudos que relacionam a atividade antioxidante da urtiga a atividade anticancerígena (ADHIKARI; BAJRACHARYA; SHRESTHA, 2016; FATTAHI et al., 2018), mais específico com o uso da espécie para o tratamento no câncer de mama (FATTAHI et al., 2013) seus rizomas são utilizados produção de fitoterápicos para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (MEN et al., 2016).

2.2. Cultura de tecidos de plantas medicinais

A cultura de tecidos vegetais é utilizada para a produção de mudas de alto padrão de qualidade genética e fitossanitária e em espécies de difícil propagação, sendo também

empregada na transformação genética, no estudo de metabólitos secundários de valor comercial e permite a produção de plântulas *in vitro* a partir de células de qualquer parte do tecido vegetal (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; ALTPETER et al., 2016).

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos, usada para a produção em larga escala de mudas sadias e livres de patógenos durante todo o ano e em condições ambientais controladas, tendo como objetivo final plantas com maior desempenho na área de interesse seja ela a produção de biomassa ou rendimento e composição dos metabólitos secundários. (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018; KARUPPUSAMY, 2009). Além disso, a técnica possibilita o estudo do ambiente no crescimento, desenvolvimento e funcionamento do metabolismo secundário de plantas medicinais. Através dela é possível controlar o microclima dentro do tubo de ensaio e observar as respostas morfofisiológica das plantas (DOU et al., 2017; RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2017).

Um dos desafios existentes para a micropropagação é que um protocolo eficiente é específico para cada espécie, devido a diferentes respostas fisiológicas e morfológicas (ISAH, 2015). No caso da *Urtica dioica* L. não foram encontrados estudos em relação a um protocolo eficiente de micropropagação até o momento.

O meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (MS) em 1962 é um meio universalmente usado em várias técnicas *in vitro*. É o meio com maior concentração em sais minerais e é constituído por: macronutrientes, micronutrientes, compostos orgânicos e vitaminas (QUISEN et al., 2008). O meio MS é amplamente utilizado na micropropagação de plantas medicinais. De acordo com Hlatshwayo et al. (2020), o meio MS é indicado para a micropropagação da *Aloe peglerae*, com enraizamento de 100% das brotações e aclimatizadas com sucesso com uma frequência de sobrevivência de 100%, após 6 semanas. Para o melhor desenvolvimento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, é indicado o uso do meio MS na concentração original dos sais, enriquecido com 1 mg L⁻¹ de ácido indol-acético (AIA) (ROKOSA, M.T.; KULPA, 2020). No orégano (*Origanum vulgare* L.) de acordo com Pandey et al. (2019), a melhor forma de micropropagação foi o cultivo em meio MS com a concentração de 50% de sais, suplementado com 50 µM de ácido indol butírico (IBA) onde as brotações apresentaram o melhor enraizamento (PANDEY et al., 2019).

O boldo (*Vernonia amygdalina*) obteve 100% de enraizamento em meio MS fortificado com ácido indol butírico (IBA) com média de 20,2cm de comprimento das raízes por brotação. E para o desenvolvimento da brotação o melhor meio foi o MS suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) e Ácido 1-naftalenoacético (ANA) apresentando 98,89% de

formação das brotações (JOSHI et al., 2020). Segundo Singh et al. (2019) para a *Bergenia ciliata* o maior número de brotações regeneradas por explante foi obtido em meio sólido MS suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) e 100% do enraizamento das brotações após 6 semanas de cultura em meio líquido MS.

Conforme Rajaram, Sriramji e Sureshkumar (2015), para o boldo (*Plectranthus bourneae*) o meio MS combinado com os hormônios 6-benzilaminopurina (BAP) e Ácido indol butírico (AIB) obteve as melhor taxas de enraizamento com sobrevivência de 83,2% das plântulas na fase de crescimento. De acordo com Carvalho et al. (2018) o meio MS com sua concentração de sais reduzida pela metade (1/2 MS) e a sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ é o indicado na micropropagação de erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.) e proporcionam melhor crescimento *in vitro* de segmentos nodais. Pode-se citar ainda o protocolo de micropropagação da *Lippia gracilis*, onde o uso da concentração com a metade dos sais MS (1/2 MS) em combinação com membranas semi permeáveis promoveu os melhores parâmetros de crescimento e resposta à área foliar dos explantes (LAZZARINI et al., 2019).

TABELA 1 – composição dos sais do meio de cultura MS

Formulação meio de cultura Murashige e Skoog		
Composto	Quantidade	Unidade
NH₄NO₃	1650	Miligramas (mg)
KNO₃	1900	Miligramas (mg)
CaCl . 2H₂O	440	Miligramas (mg)
MgSO₄ . 7H₂O	370	Miligramas (mg)
KH₂PO₄	170	Miligramas (mg)
NA₂-EDTA	37,3	Miligramas (mg)
FeSO₄ . 7H₂O	27.8	Miligramas (mg)
H₃BO₃	6,2	Miligramas (mg)
MnSO₄ . 4H₂O	22,3	Miligramas (mg)
ZnSO₄ . 4H₂O	8,6	Miligramas (mg)
KI	0,83	Miligramas (mg)
Na₂MoO₄ . 2H₂O	0,025	Miligramas (mg)
CuSO₄ . 5H₂O	0,025	Miligramas (mg)
CoCl₂ . 6H₂O	0,025	Miligramas (mg)
Sacarose	30,00	Gramas (g)
Ágar	10	Gramas (g)
Água destilada	1000	Mililitros (ml)

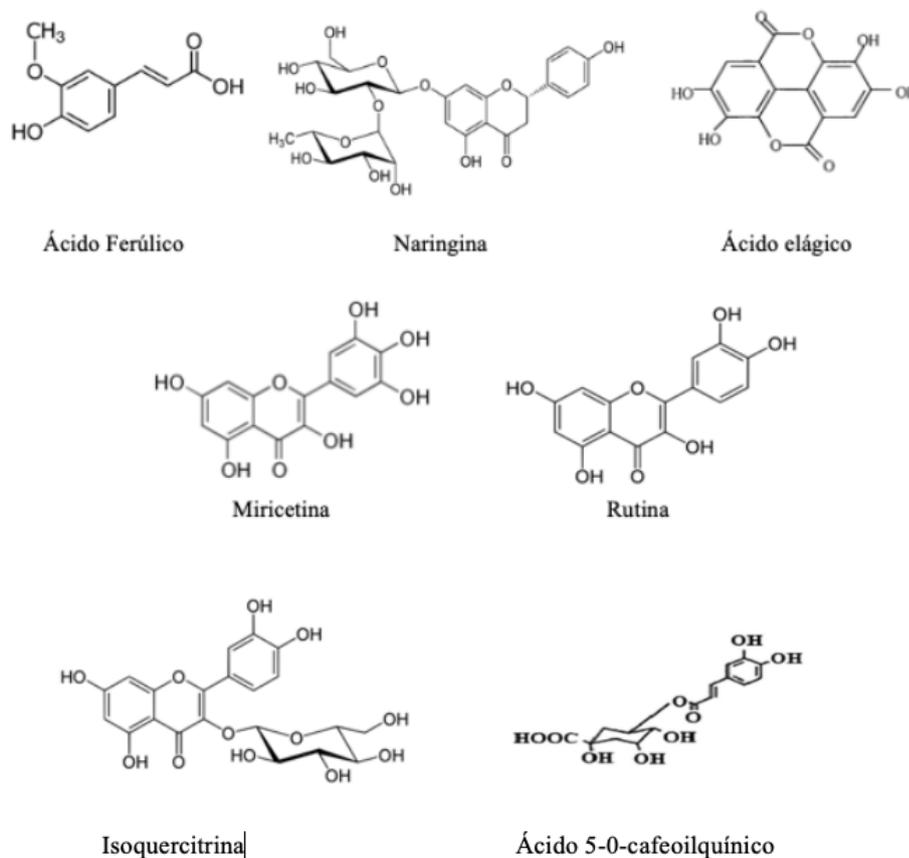
Fonte: Murashige; Skoog, 1962.

2.3. Atividade antioxidante da *Urtica dioica*

Os metabólitos secundários não possuem papel direto no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas desempenham um papel significativo no mecanismo de defesa, tendo como principal função promover a sobrevivência das plantas em condições adversas (ZANDALINAS et al. 2017). Os metabólitos secundários são geralmente classificados de acordo com sua via biossintética, sendo divididos em três grandes grupos: terpenos e esteroides, alcaloides e os compostos fenólicos (TIWARI; RANA, 2015).

O grupo dos compostos fenólicos é constituído por fenóis, ácidos fenólicos e flavonoides (AHMED; ARSHAD; KHAN, 2017), sendo importantes para melhor adaptação ao ambiente e resistência a patógenos e predadores (LI et al., 2014). Na urtiga os principais encontrados são: ácido ferúlico, naringina, ácido elágico, miricetina, quercetina, rutina, isoquercitrina e o ácido 5-0-cafeoilquínico (FIGURA 2) (ESPOSITO et al., 2019; JAN; ZARAFSHAN; SINGH, 2016.).

FIGURA 2 - Compostos bioativos encontrados em maior quantidade na *Urtica dioica*.



Fonte: Esposito et al (2019); Jan, Zarafshan e Singh (2016).

De acordo com Esposito et al. (2019) a *Urtica dioica* coletada na Itália possui os seguintes compostos: ácido ferúlico, naringina, ácido elágico, miricetina e rutina, entretanto de acordo com os autores Jan et al. (2016) encontraram os compostos: quercetina, rutina, isoquercitrina e o ácido 5-O-cafeoilquínico como majoritários. Essa diferença na composição química provavelmente ocorreu pela diferença no local da coleta, uma vez que as condições ambientais, disponibilidade hídrica, horário de coleta, nutrientes disponíveis e idade da planta afetam a composição química (NAIK; AL-KHAYRI, 2016).

Os compostos fenólicos são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante (DI SOTTO et al., 2015). Estes compostos agem no sequestro de radicais livres produzidos no metabolismo e são utilizados na prevenção de doenças ligadas ao estresse oxidativo (PISOSCHI; POP, 2015). Uma das formas para quantificar a atividade antioxidante é pelo teste de Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) (OJHA et al., 2018).

O método da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) é baseado na oxidação da fluoresceína por radicais peroxila adicionado ao teste (AAPH). Os antioxidantes presentes no extrato das plantas protegem a fluoresceína, bloqueando a reação de oxidação (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001), sendo esta atividade observada por meio de leitura da absorbância via espectrofotômetro (OJHA et al., 2018).

Existem alguns estudos que relatam a atividade antioxidante da *Urtica dioica* L. Belmaghraoui et al. (2018) quantificaram a capacidade antioxidante no mecanismo *in vitro*, usando métodos de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e capacidade de eliminação de radicais, métodos de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina sulfonato) (ABTS) demonstrando que os extratos das sementes e folhas de *U. dioica* exibem atividade antioxidante (BELMAGHRAOUI et al., 2018). Entretanto, os autores Kukrić et al. (2012) ao realizarem experimentos com espécies selvagens de urtiga coletadas na região da República Sérvia reportaram um IC₅₀ de 31,38 µg mL⁻¹ para o extrato seco de folhas, considerando a espécie de fraca a moderada capacidade antioxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de condução e obtenção do material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (DAG - UFLA), localizada no município de Lavras, Minas Gerais. O material foi coletado de plantas cultivadas em casa-de-vegetação. As exsicatas foram depositadas no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG) em novembro de 2018, sob o registro 58577.

Plantas matrizes cultivadas em casa-de-vegetação foram utilizadas para coleta de explantes. Segmentos nodais e apicais foram deixados em água corrente por 30 minutos com 5 gotas de detergente comercial. Posteriormente, os explantes foram imersos em solução 50% de água sanitária (15 minutos com agitação), seguidas de tríplice lavagem em água destilada autoclavada em capela de fluxo laminar horizontal. Em seguida, segmentos de 1 cm foram inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C. Os tubos foram encaminhados para sala de crescimento com 5 lâmpadas LED sob intensidade luminosa de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de acordo com experimentos preliminares. As plântulas foram repicadas a cada 40 dias até obtenção de material necessário para a montagem do experimento.

3.2. Descrição dos tratamentos

Foram avaliadas 4 concentrações de sais do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) nas seguintes formulações: ¼ MS, ½ MS, MS e 2MS. O meio de cultura foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem por 20 min, a 121 °C. Segmentos nodais (1 e 2º par de folhas – a partir do ápice) foram inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura. Os tubos de ensaios foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sob 5 lâmpadas de LED com intensidade luminosa de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

Após 40 dias da inoculação, foram avaliado o número de folhas, de brotos, de segmentos nodais, comprimento da parte aérea (cm) e da raiz principal (cm), área foliar (cm²), matéria seca

das folhas, caule e raiz (mg), clorofila *a*, *b* e total (mg g⁻¹ MF), carotenoides (mg g⁻¹ MF), compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (via ORAC).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, totalizando 4 tratamentos constituído de 5 repetições, com 5 tubos de ensaio por repetição, sendo um explante por tubo.

3.3. Análise de crescimento

Para analisar o crescimento, foram feitas as medidas com o uso de uma régua, começando da base da brotação até a ponta da gema apical para determinar a altura da brotação, e para o comprimento das raízes mediu-se da base da brotação até a ponta da raiz mais longa. Para a obtenção de biomassa seca, foi colocado dentro de sacos de papel kraft separadamente os caules, raízes e folhas, e depois postos em estufas de circulação forçada de ar a 37°C até alcançar peso constante, com o tempo aproximado de 72 horas. Após retirado, o material foi pesado em balança de precisão.

3.4. Análise dos pigmentos fotossintetizantes

Para a quantificação dos pigmentos fotossintetizantes foram analisados clorofila *a*, clorofila *b*, relação *b/a*, clorofila total e carotenoides. A extração desses pigmentos foi executada de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). Perante luz verde em sala escura, foram coletados 50 mg de matéria fresca de folhas. Posteriormente, foi realizado a maceração da matéria fresca coletada. Posteriormente o material foi colocado em tubos do tipo Falcon, envoltos em papel alumínio, e acrescidos de 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Logo após, os tubos foram encaminhados para a estufa, à temperatura de 65 °C, por 24h. Depois desse período, 3 mL do extrato foi coletado e colocado em cubetas de quartzo, para leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda 480 nm (carotenoides) 649 nm (clorofila *a*) e 665 nm (clorofila *b*) (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). As leituras das absorbâncias específicas foram realizadas pelo leitor TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control versão 3.37. As leituras foram realizadas em triplicata.

3.5. Fenóis totais

3.5.1. Preparação do extrato

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:H₂O (1:1), os quais foram agitados por 5 segundos no vortex 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.

3.5.2. Quantificação de fenóis totais

Para quantificar os compostos fenólicos, utilizou-se 20 µL do extrato de cada fração, em seguida adicionados 120 µL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) por 5 minutos e a 120 µL de Na₂CO₃ (7,0%), de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, com modificações em microplacas de 96 poços. Todas as amostras foram incubadas por 2 horas no escuro em temperatura ambiente. 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.

A curva de calibração foi constituída com padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich®, ≥ 98%) na faixa de 0,0078 a 0,25 mg mL⁻¹, $y = 6,2873x + 0,9239$ ($R^2 = 0,9986$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de matéria seca de folha (mgEAG gMSF⁻¹). Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata.

3.6. Análise de antioxidante pela 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 µL da amostra e 150 µL 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 µL 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 mg mL⁻¹. Como branco foram utilizados 30 µL

do tampão fosfato (75 mM e pH 7,4) em substituição ao 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 ($AUC_{amostra} - AUC_{branco}$), sendo os valores de ORAC expressos como miligrama de equivalente de Trolox por grama de matéria seca da folha ($mgET\ gMSF^{-1}$).

3.7. 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 Sisvar[®], versão 5.6 (FERREIRA, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de crescimento

A concentração dos sais do meio de cultura MS influenciou significativamente o crescimento *in vitro* da urtiga (TABELA 2). De modo geral, após 40 dias de cultivo os melhores resultados de crescimento dos explantes foram encontrados no meio com a concentração original de sais MS, apresentando maior crescimento da parte aérea (7,98 cm), crescimento da raiz (1,76 cm), número de folhas (7,5), número de segmentos nodais (3,8) e área foliar (3,9 cm²). Entretanto, não houve diferença significativa para o número de brotações (TABELA 2 e FIGURA 3).

O crescimento e desenvolvimento da *Urtica dioica* é beneficiado em solos ricos em nitrogênio, fosfato e matéria orgânica (BISHT; BHANDARI; BISHT, 2012). O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) possui alta concentração de nitrogênio (60 mM), apresenta riqueza em sais minerais e é constituído por macronutrientes, micronutrientes, compostos orgânicos e vitaminas (QUISEN et al., 2008). Provavelmente o crescimento da *U. dioica* foi favorecido pela concentração de nitrogênio disponível no meio de cultura.

Cada espécie responde fisiologicamente de maneira específica à composição do meio de cultura. Assim, o desequilíbrio tanto para o excesso quanto a falta pode acarretar em problemas de absorção dos nutrientes pelas plântulas e prejudicar seu crescimento.

Rossato, Canto-dorow e Nicoloso (2015) reportaram que para a micropropagação do quitoco (*Pluchea sagittalis* Lam.) o melhor meio para o cultivo foi utilizando ¼ dos sais em meio de cultura MS. Contudo, de Carvalho et al. (2018) ao avaliar diferentes concentrações de sais no meio de cultura concluiu que o uso de ½ sais MS promoveu o melhor crescimento de plântulas de erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.).

Em relação à área foliar, o melhor resultado foi observado com o uso do meio com concentração original de sais MS (TABELA 2). De acordo com Yin et al. (2003), há uma relação direta quantitativa entre o índice de área foliar e a disponibilidade e distribuição de nitrogênio na planta. Esse resultado está relacionado ao melhor crescimento das plântulas nessa concentração de sais, uma vez que a plântula consegue ter uma maior área de absorção da radiação, favorecendo a fotossíntese e um melhor crescimento.

FIGURA 3 - Plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS, aos 40 dias.



TABELA 2 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN) e área foliar (AF) de plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de meio MS, aos 40 dias.

Tratamentos	CPA (cm)	CR (cm)	NF	NSN	AF (cm ²)
¼ MS	4,68 b	2,12 a	5,6 b	2,8 b	1,2 b
½ MS	5,50 b	1,94 a	5,5 b	2,7 b	1,9 b
1 MS	7,98 a	1,76 a	7,5 a	3,8 a	3,9 a
2 MS	5,64 b	0,82 b	6,4 b	3,2 b	2,0 b
CV (%)	11,1	22,5	15,8	16,0	10,5

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

Diferentes concentrações de sais influenciaram na produção de matéria seca de *Urtica dioica* micropropagada. Os melhores resultados foram observados no meio MS com concentração original dos sais, sendo 5,3 mg por plântula para matéria seca das folhas, 4,6 mg da raiz, 4,1 mg do caule e 14mg da matéria seca total. O meio de cultura suplementado com apenas ¼ dos sais do meio MS obteve um ganho de matéria seca de 7,2 mg plântula⁻¹, isso

representa 94% a menos de matéria seca em relação ao meio com a concentração original de sais MS. Observa-se que o ganho de matéria seca foi até a concentração original de sais MS ocorrendo uma queda de 31% no acúmulo de matéria seca nas plântulas com maiores concentrações de sais (2MS) (TABELA 3). A maior concentração dos sais no meio de cultura pode ter levado a redução do potencial hídrico, dificultando a absorção de água e nutrientes pelas plântulas afetando o ganho de matéria seca e causado fitotoxidez nas plântulas (TABELA 3).

Pierine et al. (2019) constataram que em meio de cultura com ½ sais MS se obteve o maior acúmulo de matéria seca total com 0,81g para a micropropagação de Calabura (*Muntingia calabura* L.). O aumento das concentrações de macronutrientes e micronutrientes no meio promovem incrementos em características fitotécnicas, pois, a absorção de um dado nutriente pode ser influenciada pela concentração de outro (FIGUEIREDO et al. 2008).

TABELA 3 - Matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR) e total (MST) de *Urtica dioica* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de sais MS, aos 40 dias.

Tratamentos	MSF	MSR	MSC	MST
	mg plântula ⁻¹			
¼ MS	2,3 c	2,7 b	2,2 b	7,2 c
½ MS	3,9 b	2,5 b	2,7 b	9,1 b
MS	5,3 a	4,6 a	4,1 a	14,0 a
2 MS	3,8 b	2,6 b	4,3 a	10,7 b
CV (%)	7,06	18,1	11,9	8,10

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

4.2. Análise de pigmentos fotossintéticos

Houve diferença significativa entre os tratamentos para os pigmentos fotossintetizantes. O uso das concentrações MS e 2 MS favoreceram a concentração de clorofila *a* e clorofila total, ao passo que MS apresentou menor concentração de clorofila *b*. Não houve diferença significativa para a concentração de carotenoides (variando de 0,19 a 0,22 mg/g MF). A relação entre a clorofila *a* e *b* foi superior no meio com a concentração de MS (TABELA 4).

Segundo Taiz et al. (2017), as clorofilas tem um papel indispensável na fotossíntese, sendo responsáveis por captar a energia luminosa para início de reações fotoquímicas, sendo a clorofila *a* o principal pigmento fotossintético. Desta forma é possível relacionar o crescimento das plântulas com a concentração de clorofila.

De acordo com Kukric et al. (2012) *Urtica dioica* selvagens colhidas durante o verão na República Sérvia apresentam valores de clorofilas a igual a 0,882 mg g⁻¹, clorofila b 0,285 mg g⁻¹ e clorofila total 1,174 mg g⁻¹ MF, esses resultados se assemelham aos encontrados nesse estudo.

TABELA 4 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Urtica dioica* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de sais MS, aos 40 dias.

Tratamentos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides	Relação a/b
	mg/g MF				
¼ MS	0,73 c	0,23 a	0,96 c	0,18 a	2,77 c
½ MS	0,89 b	0,23 a	1,13 b	0,21 a	3,80 b
1 MS	1,03 a	0,20 b	1,23 a	0,19 a	5,05 a
2 MS	0,99 a	0,25 a	1,24 a	0,22 a	4,01 b
CV (%)	5,39	3,44	3,32	18,79	4,22

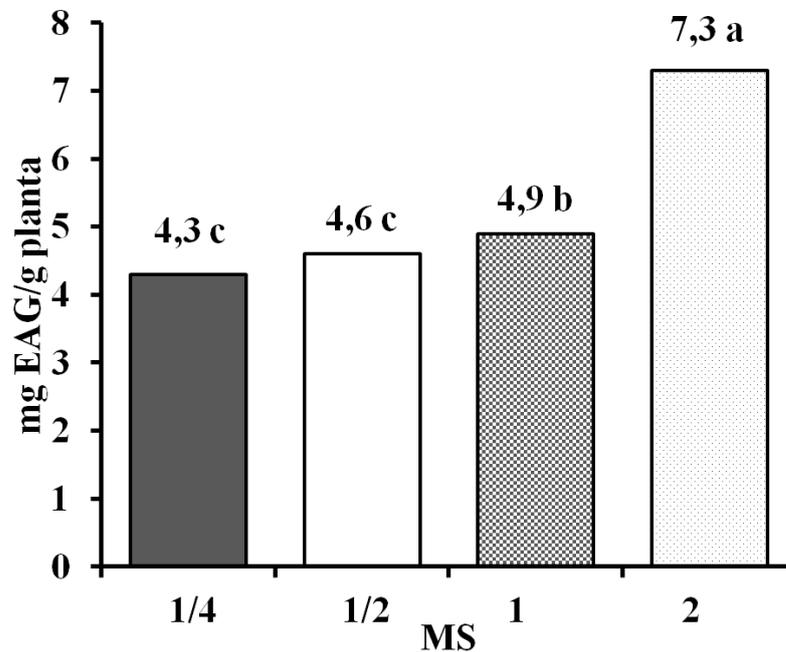
As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. MF= matéria fresca

4.3. Compostos fenólicos totais e atividades antioxidante

Houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao acúmulo de compostos fenólicos totais nas plântulas micropropagadas de urtiga (FIGURA 4). Observou-se que maiores concentrações de sais (2MS) levaram ao maior acúmulo dos compostos e maior atividade antioxidante (FIGURA 5). Provavelmente isso ocorreu devido ao estresse causado pela alta concentração de sais no meio de cultura, levando a produção de metabólitos secundários na tentativa de garantir a sobrevivência da plântula *in vitro*. Os compostos fenólicos apresentam ação antioxidante (KARIMI et al., 2013).

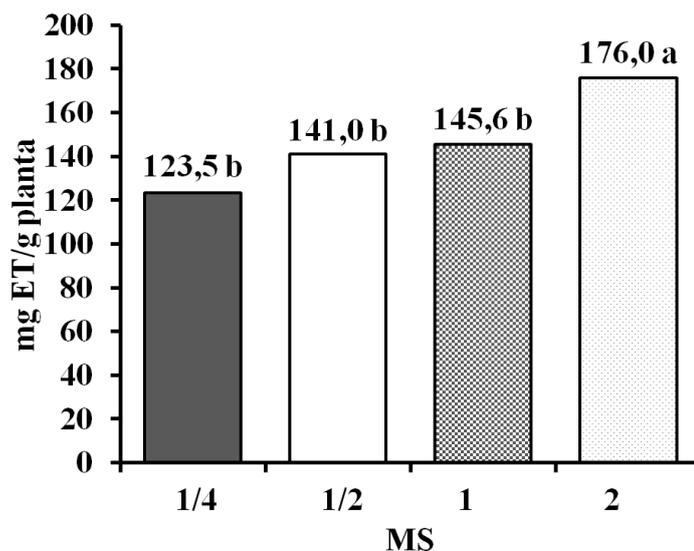
Neste estudo o uso de 2MS promoveu o acúmulo de 7,3 mg de equivalente ácido gálico por grama de folha seca, correspondendo 49% a mais em relação ao meio MS. Na atividade antioxidante o meio suplementado com 2MS foi de 176 mg de equivalente TROLOX por grama de planta pelo teste ORAC, isto representa 21% superior ao meio MS.

FIGURA 4 - Teores de compostos fenólicos totais de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, com diferentes concentrações de sais MS aos 40 dias.



As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. mgEAG/g planta = miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de matéria seca de folha.

FIGURA 5 - Atividade antioxidante de plântulas de *Urtica dioica* cultivadas *in vitro*, com diferentes concentrações de sais MS aos 40 dias pelo teste ORAC.



As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. mgET/g planta = miligrama de equivalente de Trolox por grama de matéria seca da folha.

5. CONCLUSÃO

O meio de cultura com a concentração original de sais MS favoreceu o maior crescimento e ganho de biomassa seca *in vitro* de *Urtica dioica* L. O meio suplementado com o dobro de concentração de sais (2MS) favoreceu o acúmulo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- BELMAGHRAOUI, W.; MANNI, A.; HARIR, M.; FILALI-MALTOUF, A.; EL FATNI, O.K.; EL HAJJAJI, S. Phenolic compounds quantification, antioxidant and antibacterial activities of different parts of *Urtica dioica* and *Chenopodium murale*. **Research journal os Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 12, p. 5490-5496, 2018.
- 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.
- CARVALHO, A. A. D.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Growth and volatiles in the micropropagation of Santa Maria herb. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 49, n. 4, p. 624-635, 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.
- 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 SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; SAVICKIENE, N.; STARSSELSKYTE, R.; BAKSENSKAITE, V.; DI GIACOMO, S.; VITALONE, A. Antimutagenic and antioxidant

activity of a protein fraction from aerial parts of *Urtica dioica*. **Pharmaceutical Biology**, p. 925-938, 2015.

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.

ESPOSITO, S.; BIANCO, A.; RUSSO, R.; DI MARO, A.; ISERNIA, C.; PEDONE, P.V. Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. **Molecules**, v. 24, n. 15, at.no. 2753, 2019.

FATTAHI, S.; ARDEKANI, A.M.; ZABIHI, E.; ABEDIAN, Z.; MOSTAFAZADEH, A.; POURBAGHER, R.; AKHAVAN-NIAKI, H. Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 9, p. 5317-5323, 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia** [online], v. 38, n. 2, p. 109-112, 2017.

FIGUEIREDO, M.A.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RODRIGUES, V.A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 255-257, 2008.

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.

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.

HLATSHWAYO, N.A.; AMOO, S.O.; OLOWOYO, J.O.; DOLEZAL, K.M. Efficient micropropagation protocol for the conservation of the endangered aloe *peglerae*, an ornamental and medicinal species. **Plants**, v. 9, n. 4, art. no. 506, 2020.

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

- 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.
- JANKAUSKIENE, Z.; GRUZDEVIENE, E. Investigation of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) in Lithuania. **Sociālo Zinātņu Žurnāls**, v. 1, n. 2, p. 176-186, 2013.
- JOSHI, B.; BHANDARI, A., PANWAR, G.S. An efficient micropropagation protocol for *Vernonia amygdalina* Delile—An economically valuable shrub. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, 2020.
- 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.
- KAVALALI, G.M. *Urtica*: The genus *Urtica*. Medicinal and aromatic plants. **Industrial profiles**, p. 36, 2003.
- 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.
- 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.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, 148:350-382, 1987.
- MEN, C.; WANG, M.; AIYIRETI, M.; CUI, Y. The efficacy and safety of *Urtica dioica* in treating benign prostatic hyperplasia: A systematic review and meta-analysis. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 2, p. 143-150, 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.
- 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.

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.

PANDEY, S.; BELWAL, T.; TAMTA, S.; BHATT, I. D.; RAWAL, R.S. Phenolic compounds, antioxidant capacity and antimutagenic activity in different growth stages of *in vitro* raised plants of *Origanum vulgare* L. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2231-2241, 2019.

PIERINE, F.R.; GIANINI, P.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. *In vitro* germination and seedling growth of *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) in diferente culture médium. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 74, n. 4, art e2019002, 2019.

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.

QUISEN, R.G.; ANGELO, P.C.S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazonia Ocidental**. 1 ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

RAJARAM, K.; SRIRAMJI P.; SURESHKUMAR, P. Micropropagation, antioxidant and antimicrobial effect of *Plectranthus bourneae* Gamble: An endangered medicinal plant. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 142-147, 2015.

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.

ROKOSA, M.T.; KULPA, D. Micropropagation of stevia rebaudiana plants [Micropropagação de plantas de *Stevia rebaudiana*]. **Ciência Rural**, v. 50, n. 1, art. no. e20181029, 2020.

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.

ROSSATO, L.V.; CANTO-DOROW, T.S.; NICOLOSO, F.T. Micropropagation of *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **Revista brasileira plantas medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 239-245, 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.

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.

SINGH, M.; PANDEY, A. *In vitro* propagation of *Bergenia ciliata* Sternb: A valuable medicinal and ornamental plant of Sikkim Himalaya. **Medicinal Plants**, v. 11, n. 2, p. 191-194, 2019.

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

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

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, n. 3, p. 661–670, 2015.

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.

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.

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.

YIN, X.; LANTINGA, E. A.; SCHAPENDONK, A. H.; ZHONG, X. Some quantitative relationships between leaf area index and canopy nitrogen content and distribution. **Annals of botany**, v. 91, n. 7, p. 893-903, 2003.

ZANDALINAS, S. I.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Modulation of antioxidante defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. **Frontiers in plant Science**, v. 8, at. no. 953, 2017.