

ALINE NUNES

**ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *HYPERICUM PERFORATUM***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Dr^a. Mari Inês Carissimi Boff

Co-orientador: Dr. Pedro Boff

LAGES

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Nunes, Aline

Altas diluições dinamizadas na germinação, crescimento e produção de compostos fenólicos de *Hypericum perforatum* / Aline Nunes. -- 2019.

92 p.

Orientadora: Mari Inês Carissimi Boff

Coorientador: Pedro Boff

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

1. Plantas medicinais. 2. Erva-de-São-João. 3. Preparados homeopáticos. 4. Homeopatia. I. Boff, Mari Inês Carissimi . II. Boff, Pedro. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Título.

ALINE NUNES

**ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS NA GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *HYPERICUM PERFORATUM***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientadora:

Dr^a Mari Inês Carissimi Boff
UDESC/Lages, SC

Membro:

Dr. Cristian Soldi
UFSC/Campus Curitibanos, SC

Membro:

Dr^a. Simone Silmara Werner
EPAGRI/Lages, SC

Membro:

Dr^a. Tatiani Alano Modolon
UNEAGRO/Tubarão, SC

A minha mãe que me ensinou a correr atrás dos meus sonhos e que me mostrou que desistir não faz parte de mim. Por me ensinar não com palavras, mas por seus atos. Por me apoiar em cada momento e cada decisão que já precisei tomar. Por ser a pessoa que é, por ser mãe e pai ao mesmo tempo. Por ter orgulho e não vergonha de quem eu sou. Por me mostrar que o amor vence o ódio e que é somente através deste que construímos algo sólido para nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Mãe Natureza.

Agradeço a minha mãe Eunice, minha guerreira e heroína, que me mostrou que não se deve ter medo do mundo. Que por suas ações e palavras me levaram a ser quem sou hoje. Que foi mãe e pai ao mesmo tempo, incentivando em todos os momentos da minha vida e apoiando em todas as decisões.

A minha irmã Karine por todo incentivo e apoio. Que mostrou que a força de vontade é maior que tudo e pode superar qualquer dificuldade.

A minha namorada Mariane por me ajudar a crescer intelectualmente, me aguentar nos momentos mais difíceis e por construir um futuro ao meu lado.

Aos meus sogros que me acolheram quando precisei e me aconselharam a continuar em busca dos sonhos.

Aos meus orientadores Profa. Mari Inês Carissimi Boff e Dr. Pedro Boff, por todo o percurso percorrido. Por me mostrarem como evoluir tanto intelectualmente como pessoalmente. Que com os seus gestos e ações pode-se correr atrás dos sonhos, ser e fazer a diferença.

A Universidade do Estado de Santa Catarina por me proporcionar um estudo de qualidade com professores excelentes. As instituições EPAGRI e Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura para realização da pesquisa.

A bolsa de estudos, Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior (Fumdes), por auxiliar financeiramente para dispor o tempo e foco somente para minhas pesquisas.

A laboratorista Elisângela por toda manutenção nos experimentos, pela amizade e companheirismo. Por ser sempre está pessoa contente e feliz e por transmitir isso as outras pessoas.

A pesquisadora Dra. Simone Silmara Werner, por todo o apoio durante a pesquisa e por me incentivar a continuar crescendo.

Ao professor Dr. Cristian Soldi, por dispor do seu tempo para me ensinar e auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho e Dr. Marcelo Maraschin, que foram essenciais nas ideias e auxílio para o andamento da pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal, Leysa, Rovier, Mayara, Mariangela, Cezário, Cíntia, Leonardo, Thabata, Sérgio, Moises e Cláudio, que contribuíram de alguma forma na pesquisa e cultivaram uma bela amizade neste momento tão importante para todos nós.

Aos técnicos de campo da Estação Experimental da EPAGRI, Lages/SC.

A minha amiga Geyce dos Santos, que sempre apoiou o meu crescimento e culminou debates intelectuais que agregaram para toda a vida. Que foi babá dos meus gatos sempre que eu precisei. Que mostrou que a verdadeira amizade perdura anos e é uma das coisas mais importantes que temos na vida.

Ao laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal, não somente pela estrutura, mas por acolher, cultivar amizades e influir sobre o crescimento intelectual.

“O maior inimigo do conhecimento não é a
ignorância; é a ilusão do conhecimento”

Stephen Hawking

RESUMO

NUNES, Aline. **Altas diluições dinamizadas na germinação, crescimento e produção de compostos fenólicos de *Hypericum perforatum***. 2019. 89p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

Hypericum perforatum é utilizado como planta medicinal, principalmente, para tratamento de depressão leve e moderada. A espécie tornou-se alvo de inúmeros estudos dado possuir compostos biologicamente ativos. Nativa da Europa, possui dificuldade de estabelecimento no Brasil, pois não atinge porte adequado e não floresce. As sementes apresentam dormência endógena e exógena, e seu cultivo exigem práticas específicas. A utilização de preparados em altas diluições dinamizadas, homeopáticas, apresentam a característica de não serem tóxicos e nem residuais às plantas, ao meio ambiente e ao homem. O objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos das altas diluições dinamizadas na germinação, crescimento e produção dos compostos fenólicos de *Hypericum perforatum*. No experimento de germinação, foram realizados testes de temperatura (20, 25 e 30 °C), ensaios com preparados homeopáticos de *Silicea terra*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Kali carbonicum*, nas diluições centesimais hahnemannianas 6, 12, 20 e 30CH. Atributos de desenvolvimento das plantas foram avaliados em dois experimentos nas épocas de plantio primavera e verão. O delineamento foi completamente casualizado com 5 tratamentos, 12 repetições, com 48 plantas por tratamento. Os experimentos foram iniciados em sala climatizada e, posteriormente, transplantados em vaso e levados a casa de vegetação. A aplicação dos preparados homeopáticos foi realizada semanalmente. Com a coleta de material realizada aos 4 meses foi realizada contagem de glândulas escuras na face abaxial nas folhas, sendo 5 folhas por planta, totalizando 240 folhas por tratamento. O material remanescente foi seco em estufa para a preparação do extrato hidroalcoólico das folhas. Com a escolha dos tratamentos *Silicea terra* e controle submeteu-se o extrato a evapotranspiração para realização posterior da análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para os testes de germinação avaliou-se a porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Germinação, Tempo Médio de Germinação e plântulas viáveis com cotilédones. As variáveis do cultivo foram altura do principal ramo, altura final, comprimento da raiz principal, número de ramificações, massa fresca e massa seca. As glândulas escuras nas folhas foram avaliadas por meio de contagem com auxílio de microscópio estereoscópico. Nas análises HPLC, determinou-se a comparação do perfil de compostos fenólicos entre os diferentes tratamentos. Dados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do ambiente R, considerando o nível de 5% de significância. Verificou-se que 25 °C é a temperatura adequada para germinação das sementes. A utilização de *Kali carbonicum* aumenta em 8% a taxa germinativa e a variação das centesimais hahnemannianas possuem efeito ondulatório sobre as sementes da espécie. Número de ramificações, altura e rendimento de biomassa foram maiores quando iniciado cultivo na primavera. Para o crescimento semanal, na primavera os preparados homeopáticos não atuaram sobre a altura das plantas, mas *Natrum muriaticum*, *Kali carbonicum* e *Phosphorus* foram eficientes no cultivo de verão. Não houve incremento nas glândulas escuras com os preparados homeopáticos, assim como, não houve maior produção dos fenólicos, sendo que a época de cultivo influenciou maiores resultados sobre ambas as variáveis. A homeopatia tem se mostrado como instrumento eficiente no manejo de plantas medicinais.

Palavras-chave: plantas medicinais, Erva-de-São-João, preparados homeopáticos, homeopatia.

ABSTRACT

NUNES, Aline. **Dynamized High dilutions in the germination, growth and production of phenolic compounds of *Hypericum perforatum***. 2019. 89p. Dissertation (Master's Degree in Plant Science) – Santa Catarina State University – UDESC, Center of Agroveterinarian Science – CAV. Postgraduate Program in Plant Science, Lages, 2019.

Hypericum perforatum is used as a medicinal plant, mainly for the treatment of mild and moderate depression. The species has become the target of numerous studies due to biologically active compounds. It is native from Europe and its cultivation in Brazil present difficulties on growing and flourish. The seeds have endogenous and exogenous dormancy, which need particular treatment. Dynamized high dilution preparations are suitable to use because are non-toxic to plants, environment and human being as well. The objective of the research was to evaluate the effects of dynamized high dilutions on the germination, growth and production of the phenolic compounds of *Hypericum perforatum*. Germination was tested at 20, 25 and 30 °C. Homeopathic preparations of *Silicea terra*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* and *Kali carbonicum*, all at 6, 12, 20, and 30CH centesimal hahnemannian dilution were performed. Two distinct experiments were carried out in planting seasons of spring and summer. The design was completely randomized with 5 treatments, 12 replicates, with 48 plants per treatment. The experiments were started in an air-conditioned room and later transplanted in a pot and taken to greenhouse. The application of homeopathic preparations was done weekly. Dark glands were counted at 4th months on the abaxial face of the 5 leaves per plant, having 240 leaves per treatment. The remaining material was dried in an oven for the preparation of the hydroalcoholic extract of the leaves. With the choice of *Silicea terra* and control treatments the extract was submitted to evapotranspiration for further analysis in high performance liquid chromatography (HPLC). The germination was expressed by percentage, Speed Index, Time and viable seedlings. The height of the main branch was weekly measured. At harvest, the height of main branch, the length of main root, number of branches, fresh mass and dry mass were assessed. Dark glands on the leaves were counted under microscopic stereoscopic. The HPLC analysis was performed to compare the profile of phenolic compounds among the different treatments. All data were analyzed with the aid of the R environment, considering the 5% level of significance. It has been found that 25 °C is the temperature suitable for seed germination. *Kali carbonicum* increases the germination rate by 8% and the increase of hahnemannian centesimals have an undulating effect on the seeds of the species. Number of branches, height and yield of biomass were higher when the crop was started in the spring. The homeopathic preparations did not act on the height of the plants at spring, but *Natrum muriaticum*, *Kali carbonicum* and *Phosphorus* were efficient in the summer crop. There was no increase in the dark glands with the homeopathic preparations and nor higher production of the phenolics. The growing season influenced higher results on both variables. Homeopathy has the potential to help cultivate herbs.

Key words: medicinal plants, St. John's Wort, homeopathic preparations, homeopathy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Haste mostrando formato arredondado do caule e disposição das folhas (B); Plantas de *Hypericum perforatum* em campo nativo na Europa (A); *H. perforatum* em casa de vegetação em Lages/SC (C). 23
- Figura 2 – Pétalas de *Hypericum perforatum* com glândulas escuras nas bordas (A); folha de *H. perforatum* com glândulas translúcidas na face adaxial (B). 24
- Figura 3 – Repertorização com software Homeopro[®] (matéria médica homeopática para humanos). 32
- Figura 4 – Sementes de *Hypericum perforatum* dispostas em caixa Gerbox[®], constituindo uma unidade experimental. 34
- Figura 5 - Fisiologia da semente de *Hypericum perforatum* durante o processo de germinação: A) Semente; B) Rompimento do Hilo; C) Surgimento de Hipocótilo; D) Radícula e formação de raízes secundárias. 38
- Figura 6 – Surgimento de cotilédones em *Hypericum perforatum*. 39
- Figura 7 - Porcentagem de germinação da semente de *Hypericum perforatum* submetidos a diferentes preparados homeopáticos na dinamização 12 CH. 40
- Figura 8 – Parcelas experimentais em sala climatizada de plantas de *Hypericum perforatum*, dispostas de acordo com rodízio semanal para aplicação dos tratamentos com altas diluições dinamizadas. 49
- Figura 9 – Crescimento semanal do ramo principal de plantas de *Hypericum perforatum* submetido a tratamentos com altas diluições dinamizadas. A) Exp.-Primavera/verão; B) Exp.-Verão/outono. 52
- Figura 10 – Plantas de *Hypericum perforatum* ao final do experimento em casa de vegetação, Lages/SC, 2018. A) Exp.-Primavera/verão; B) Exp.-Verão/outono. 55
- Figura 11 – Variação da temperatura (°C) predominante no município de Lages/SC, entre os meses de outubro de 2017 e maio de 2018. Lages/SC, 2018. 58
- Figura 12 – Folhas de *Hypericum perforatum* utilizadas para contagem de glândulas escuras. 65
- Figura 13 – Sequência do processo de maceração exaustiva: (A) Folhas de *Hypericum perforatum* submersas em álcool 92 INPM; (B) Filtragem do resíduo após 7 dias; (C) Utilização de Rotaevaporador para a concentração dos extratos; (D) Uso de

pipeta de vidro para retirada do material no balão volumétrico; (E) Extratos prontos para análise após remoção da água residual em liofilizador..... 67

Figura 14 – Estruturas morfológicas que armazenam compostos bioativos em plantas de *Hypericum perforatum*. A) Glândulas translúcidas na face adaxial das folhas; B) Glândulas escuras na face abaxial das folhas. 70

Figura 15 – Cromatografia dos compostos de extrato alcoólico de *Hypericum perforatum* no comprimento de onda 320 nm no Exp.-Primavera/verão (T4R3A) e Exp.-Verão/outono (T4R3B). 71

Figura 16 – Cromatografia dos compostos de extrato alcoólico de *Hypericum perforatum* no comprimento de onda 320 nm para o controle (T4R3B) e para *Silicea terra* (T5R3B). 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Porcentagem de germinação (G%), Índice de Velocidade da Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas com cotilédones de sementes de *Hypericum perforatum* submetidas a diferentes temperaturas em laboratório. Lages/SC, 2018.....36
- Tabela 2 – Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas com cotilédones de sementes de *Hypericum perforatum* submetidas ao tratamento com diferentes preparados homeopáticos na 12CH. Lages/SC, 2018. 40
- Tabela 3 – Influência das diferentes ordens de dinamizações centesimais hahnemannianas (CH) do preparado homeopático *Kali carbonicum* na porcentagem de germinação (%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo Médio de Germinação de sementes de *Hypericum perforatum*.42
- Tabela 4 – Crescimento vegetativo de plantas de *Hypericum perforatum* cultivadas em casa de vegetação e tratadas com diferentes preparados homeopáticos. Lages/SC, 2018. ..53
- Tabela 5 – Altura média do maior ramo e número de ramificações (\pm Erro padrão) apresentado por plantas de *Hypericum perforatum*, tratadas com diferentes preparados homeopáticos e cultivadas em casa de vegetação, Lages/SC, 2018.54
- Tabela 6 – Comprimento médio (cm) e massa fresca da raiz (\pm Erro padrão) de plantas de *Hypericum perforatum* submetidas ao tratamento com diferentes altas diluições dinamizadas, Lages/SC, 2018.56
- Tabela 7 – Valores médios (\pm Erro padrão) da massa fresca da parte aérea e massa seca geral e por planta da parte aérea de *Hypericum perforatum*, Lages/SC, 2018.57
- Tabela 8 – Número médio (\pm Erro padrão) de glândulas escuras presentes na face abaxial das folhas de plantas de *Hypericum perforatum* tratadas com diferentes altas diluições dinamizadas.....69
- Tabela 9 – Compostos biologicamente ativos obtidos através de extrato hidroalcoólico de *Hypericum perforatum*, tempo de retenção no comprimento de onda 320 nm e porcentagem da área.....73

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| 2 CAPÍTULO 1 - VIABILIDADE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> L. SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS E TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES..... | 27 |
| 2.1 RESUMO..... | 27 |
| 2.3 INTRODUÇÃO | 29 |
| 2.4 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 2.4.1 Temperatura | 31 |
| 2.4.2 Altas diluições dinamizadas | 32 |
| 2.4.3 Centesimal Hahnemanniana | 34 |
| 2.4.4 Análise estatística | 35 |
| 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 2.5.1 Teste de germinação de sementes submetidas a diferentes temperaturas | 36 |
| 2.5.2 Teste de germinação de sementes submetidas a diferentes preparados homeopáticos | 39 |
| 2.5.3 Teste de germinação de sementes submetidas ao preparado <i>Kali carbonicum</i> | 41 |
| 2.6 CONCLUSÃO..... | 43 |
| 3 CAPÍTULO 2 – CRESCIMENTO VEGETATIVO DE PLANTAS DE <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> L. EM DIFERENTES ÉPOCAS DE CULTIVO E SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS | 45 |
| 3.1 RESUMO | 45 |
| 3.2 INTRODUÇÃO..... | 47 |
| 3.3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 48 |
| 3.3.1 Avaliações..... | 50 |
| 3.3.2 Análise estatística | 50 |
| 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 3.5 CONCLUSÃO..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 4 CAPÍTULO 3 - INCREMENTO DE GLÂNDULAS ESCURAS E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> L. SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS | 61 |
| 4.1 RESUMO | 61 |
| 4.2 INTRODUÇÃO | 63 |
| 4.3 MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 4.3.1 Semeadura e cultivo | 64 |
| 4.3.2 Avaliação das glândulas escuras | 65 |
| 4.3.3 Preparação dos extratos hidroalcoólicos | 65 |
| 4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 67 |
| 4.3.5 Análise estatística | 68 |
| 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 4.5 CONCLUSÃO | 75 |
| | |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 77 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 79 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas para fins medicinais acompanha a história da humanidade no tratamento de inúmeras enfermidades (FIRMO et al., 2011). No Brasil, a prática de utilizar plantas medicinais transpassa gerações e se constitui em patrimônio cultural. Fernandes e Boff (2017) demonstram que é frequente o uso de plantas medicinais em base ao receituário popular transmitido vocalmente, mesmo em situação de casos agudos, que tem, teoricamente, maior risco de vida. Esse conhecimento, denominado de medicina popular, é fonte inicial no desenvolvimento de novos medicamentos farmacêuticos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; SANTOS; ROSITO, 2012). De acordo com Calixto (2005) mesmo com os diversos avanços da medicina moderna nas últimas décadas, estima-se que 25% a 30% dos fármacos ainda são inspirados nas propriedades de plantas medicinais.

A planta medicinal, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é considerada toda a planta ou partes desta que contenham substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de práticas tradicionais para manutenção da saúde, sendo que 85% utiliza plantas medicinais ou preparações destas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). A OMS ressalta a necessidade da valorização na utilização destas plantas, tanto para uso de âmbito sanitário, como no cuidado integrativo da saúde. A procura pelas plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) teve crescimento de 161% entre 2013 e 2015 (BRASIL, 2016). Os fitoterápicos destacam-se de forma significativa, também, no mercado global de medicamento, movimentando cerca de US\$ 21,7 bilhões ao ano. No Brasil, estima-se que em média US\$ 160 milhões são movimentados por ano (CARVALHO et al., 2008). Além disso, plantas medicinais são meios de fortalecimento das comunidades na interação entre famílias que socializam conhecimentos entre seus membros e as utilizam em processos de cura solidários, tanto pelas propriedades bioativas ou pelos símbolos do imaginário popular (FERNANDES; BOFF, 2017).

A maior ênfase e demanda requerida das plantas pela medicina está relacionada com os princípios ativos que sintetizam e armazenam durante seu crescimento (FARIAS et al., 2016). Compostos bioativos encontram-se em diferentes combinações, cada qual com determinada ação principal ao organismo enfermo (ANDERSON; CHANG; MCLAUGHLIN, 1998). De acordo com Carlini et al. (2006), muitas plantas que foram ou estão sendo estudadas, mostram capacidade de atuar, também, em sintomas de comportamento, humor, pensamento e sensações,

além dos físicos, propriamente ditos. De acordo com Mueller et al. (2004), *Hypericum perforatum* é um típico exemplo desses efeitos pelo uso popular no tratamento às depressões e sua ação comprovada na terapia das dores oriundas do sistema nervoso periférico.

As primeiras publicações sobre o uso de *Hypericum* no tratamento de enfermidades datam o século II a.C., sendo mencionadas por Dioscórides, Galeno e Plínio, a partir dos estudos anteriormente realizados por Hipócrates. Os relatos mostram ter sido o uso de uma espécie de *Hypericum*, provavelmente *H. perforatum*, como cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico (ROBSON, 1977). A palavra *Hypericum* têm sua origem grega onde “*Hyp*” quer dizer acima e “*ericum*”, imagem (ROBSON, 1977). As plantas desse gênero possuem conotação religiosa, sendo utilizada para “pôr acima da figura”, acreditando-se assim, no afastamento de espíritos malignos. Seus estames proeminentes são, também, destaque nas flores de *Hypericum*. O gênero *Hypericum* é da família botânica Hypericaceae, ordem Malpighiales e Classe Magnoliopsida (COLE; HILGER; CARVALHO, 2016). Hypericaceae comporta, aproximadamente, 500 espécies distribuídas nas regiões temperadas e subtropicais (ROBSON, 2012; CRONQUIST, 1981). No Brasil, são encontradas 22 espécies, sendo que 19 destas são recorrentes no Rio Grande do Sul (BITTRICH et al., 2015). Espécies do gênero *Hypericum* apresentam características semelhantes com flores actinomorfas, hermafroditas, cálice de 4 a 5 sépalas desiguais, imbricadas ou valvados. Corola hipógina de 4 a 5 pétalas assimétricas, amarelas, vermelhas ou alaranjadas. Tanto nas pétalas como nas sépalas apresentam glândulas amarelas ou pretas. O gênero chama atenção por exibir estames muito proeminentes e em grande número (NÖR, 2006).

Hypericum perforatum é a espécie do gênero *Hypericum* que apresenta as maiores pesquisas sobre compostos ativos. O *H. perforatum* é uma planta herbácea perene, que está distribuída na Europa, Ásia, norte da África e Estados Unidos (PENG; YUAN; YE, 2005; DINIZ; ASTARITA; SANTARÉM, 2007). É conhecido popularmente no Brasil como erva-de-São-João, hipérico, orelha-de-gato, alecrim-bravo, arruda-de-São-Paulo, milfurada e arruda-do-campo. Internacionalmente, a planta é conhecida como St. John’s Wort (BUFALO, 2007). O tamanho médio do *H. perforatum* é de 60 cm, mas pode atingir até 1 m de altura. Apresenta sementes bastante pequenas, alongadas e com extremidades arredondas. Quando estas são expostas ao solo em temperaturas mais altas, germinam após alguns dias (ARNCKEN, 2000; BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002; ROSE, 2006). O caule é arredondado e apresenta duas linhas longitudinais salientes, ereto e ramificado no topo. As folhas podem ser ovadas e lineares, de 7 a 40 mm de comprimento, subcordatas, planas ou moderadamente revolutas, apresentando consistência e superfície elásticas, com coloração verde-azulada, opaca e sem brilho

(BOMBARDELLI; MORAZZONI, 1995; ARNCKEN, 2000; BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002) (Figura 1). No Brasil, por não florescer, o crescimento fica restrito à fase vegetativa, com ramificações curtas eretas, mas que tornam-se prostradas a medida que avançam no ciclo (Figura 1C).

Figura 1 – Haste mostrando formato arredondado do caule e disposição das folhas (B); Plantas de *Hypericum perforatum* em campo nativo na Europa (A); *H. perforatum* em casa de vegetação em Lages/SC (C).



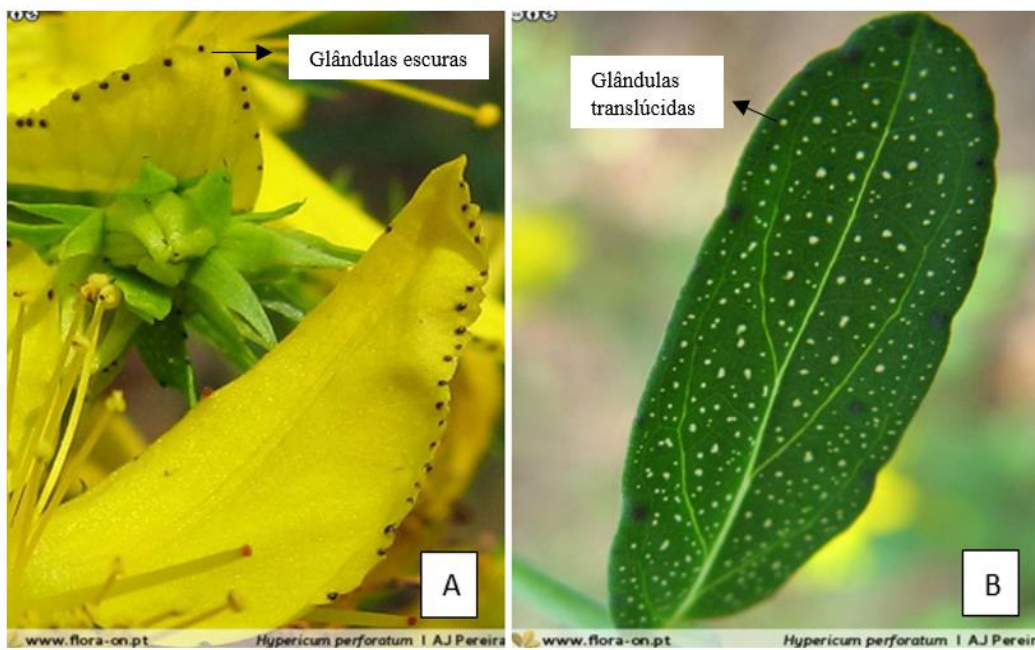
Fonte: (A, B) - FLORA-ON. *Hypericum perforatum*. Disponível em: <http://flora-on.pt/#/0yd_5>. Acesso em 18 mai. 2018. (C) – Elaborado pelo autor, 2018.

Nas folhas encontram-se numerosas glândulas transparentes que secretam óleo, podendo formar uma camada incolor sobre as folhas (Figura 2A). Pontuações glandulares podem variar de pretas a castanhas (BOMBARDELLI; MORAZZONI, 1995; ARNCKEN, 2000; BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002). A floração, própria no cultivo europeu, apresenta flores de forma numerosa, com coloração amarelo-alaranjada, brilhante e dispostas em cimeiras numa espécie de inflorescência paniculada composta. O cálice e a corola são marcados por pequenos pontos pretos, conhecido como hipericina (Figura 2B). As pétalas se apresentam em número de cinco, sendo oblongas e elípticas, assimétricas com presença de pontuações glandulares de hipericina (COLETA, 2008; BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002). O período de floração na Europa, acontece entre maio e outubro, com pico em junho (BOMBARDELLI; MORAZZONI, 1995).

A raiz do *H. perforatum* apresenta consistência lenhosa e resistente. Esta característica é percebida desde a plântula. A cor é amarelo-acastanhada, sendo que sua superfície é coberta

de anéis com escamas e durante o crescimento a raiz muda de direção em várias vezes (ARNCKEN, 2000).

Figura 2 – Pétalas de *Hypericum perforatum* com glândulas escuras nas bordas (A); folha de *H. perforatum* com glândulas translúcidas na face adaxial (B).



Fonte: FLORA-ON. *Hypericum perforatum*. Disponível em: <http://flora-on.pt/#/0yd_5>. Acesso em 18 mai. 2018.

Na literatura, há relatos da presença de aminoácidos, vitamina C, taninos, carotenoides, cumarina, antraquinonas/naftodiantronas, derivados de floroglucinol, flavonoides, óleos voláteis e xantonas (GREESON; SANFORD; MONTI, 2001; HUSSAIN; ANSARI; ARIF, 2009; RUSSO et al., 2013). No entanto, estudos recentes evidenciam que a espécie *H. perforatum* apresenta uma substância diferente, da qual poderia conter propriedades medicinais ainda desconhecidas. Esta substância está presente nos pequenos pontos pretos presentes na planta, que contêm elevadas concentrações de um pigmento vermelho, a hipericina (SNOW, 1996). De acordo com Mueller et al. (2004), estudos relacionados aos efeitos de hipericina ao organismo, demonstram alta eficácia no tratamento de depressão.

A ação de hipericina demonstra que através de extratos orgânicos e aquosos de *H. perforatum* os mesmos têm potencial antidepressivo equivalente aos fármacos convencionais, sem apresentar os efeitos colaterais e nem efeito rebote (KASPER et al., 2010; RUSSO et al., 2013). É relatada, também, no tratamento de depressão unipolar leve e moderada (UZBAY et

al., 2006). Szegedi et al. (2005) evidenciam que até mesmo em casos de depressão grave a planta tem se mostrado eficaz.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o Brasil tem a maior taxa de pessoas com depressão da América Latina, correspondente a 5,8% da população (WHO, 2017). Nessa questão, surge o abuso de prescrições dos antidepressivos químicos sintéticos (benzodiazepínicos), sendo apontados como problema grave na saúde pública do país por apresentar efeitos colaterais indesejáveis, causados tanto pela inespecificidade farmacológica como pela superdosagem. Muitos desses antidepressivos tem seu registro suspenso dados os efeitos colaterais (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; WAGNER, 2015).

Mesmo conhecendo as características fitoterápicas de *Hypericum perforatum*, a matéria-prima que é comercializada e consumida no Brasil é importada de outros países, pois a espécie não obteve boa adaptação no país. Estudos demonstram que a planta não atinge o porte adequado, não floresce e não produz sementes (FARON et al., 2004). Conforme Popinigis (1985) e Carvalho e Nakagawa (2012), fatores climáticos podem influenciar no momento da germinação e crescimento, visto que estas necessitam, constantemente, de água, oxigênio, temperatura e luminosidade em níveis ótimos. Faron et al. (2004) e Alves et al. (2014) ressaltam que devido a relevância terapêutica dos compostos ativos de *H. perforatum*, é desejável estudos acerca da germinação e crescimento da planta, assim como, métodos que induzem a biossíntese e o acúmulo de metabólitos secundários, principalmente, em relação a hipericina. No entanto, é necessário a utilização de produtos não residuais na planta, por se tratar de uma planta medicinal segundo estabelece o Ministério da Saúde em sua normativa IN nº 4 de 2014 (BRASIL, 2014a). Nessa normativa consta que tratamentos em cultivos de plantas medicinais não deve haver quaisquer tipos de substâncias tóxicas, não permitindo a utilização de agrotóxicos. Portanto, a inclusão de terapêuticas não residuais faz-se necessária para o cultivo de espécies medicinais. Preparados em altas diluições dinamizadas – preparados homeopáticos – na agricultura não deixam resíduos químicos e podem facilitar a quebra de dormência, crescimento vegetativo e incremento de metabólitos secundários (ESPINOZA, 2001; ROLIM et al., 2006).

A terapêutica homeopática foi proposta por Samuel Hahnemann em 1796 para a medicina humana (HAHNEMANN, 2007). Posteriormente, levada à agricultura por Kolisko e Kolisko em 1923, com base nos fundamentos de Hahnemann, em que se preconizava a aplicação de preparados em altas diluições em espécies vegetais (KOLISKO; KOLISKO, 1978).

A homeopatia é uma terapêutica não residual, amparada pela Instrução Normativa nº 17 de 2014 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para produção orgânica de vegetais e animais. É considerada uma tecnologia social por ser de baixo custo e de fácil aplicação, possibilitando o uso a todos os agricultores sem causar dependência a unidade familiar agrícola (CUPERTINO, 2008; BRASIL, 2014b). A utilização de homeopatia permite trazer equilíbrio, harmonia e saúde para todo o sistema, fornecendo um manejo agroecológico e sustentável (ANDRADE; CASALI, 2011). Desse modo, a aplicação de preparados homeopáticos possibilita o cultivo de plantas medicinais, atuando sobre os processos biológicos e conseqüentemente sobre os metabólitos secundários (BOFF, 2008; CAPRA et al., 2014).

O objetivo da pesquisa de dissertação de mestrado foi avaliar o efeito de preparados em altas diluições dinamizadas na germinação, crescimento e produção de compostos fenólicos da planta medicinal *Hypericum perforatum*.

2 CAPÍTULO 1 - VIABILIDADE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *HYPERICUM PERFORATUM* L. SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS E TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES

2.1 RESUMO

A espécie *Hypericum perforatum* é utilizada como planta medicinal, principalmente, no tratamento antidepressivo. Nativa da Europa, possui dificuldades quanto ao estabelecimento de seu cultivo no Brasil, não atinge porte adequado, não floresce e assim não produz sementes. Para produção de mudas de *H. perforatum* é necessário estudar a temperatura e tratamentos adequados que favoreçam a germinação das sementes. Por se tratar de uma espécie medicinal, a utilização de tratamentos não residuais deve ser considerada, uma vez que resíduos químicos podem alterar a eficiência terapêutica. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e de preparados em altas diluições dinamizadas na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. Realizou-se três bioensaios em câmaras de germinação, utilizando delineamento experimental inteiramente casualizado. O primeiro consistiu em avaliar a temperatura de 20, 25 e 30 °C, mantidas em escuro contínuo, com 20 repetições de 50 sementes cada parcela. No segundo, foram utilizados os preparados de *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra* na 12CH (ordem de diluição centesimal hahnemanniana). Foram utilizadas 4 repetições com 50 sementes cada. No terceiro experimento, utilizou *Kali carbonicum* na 6, 12, 20, 30CH, com 50 sementes em cada das 4 repetições. Avaliou-se a porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas viáveis com cotilédones. Os dados foram analisados por meio do ambiente R, utilizando teste Tukey a 5% de significância. A temperatura de 25 °C proporcionou melhores resultados quanto a germinação, sendo 63% das sementes. Sementes tratadas com *Kali carbonicum* mostraram maior velocidade e taxa germinativa, aumentando em 8% em relação ao controle (70,75%). *Kali carbonicum* teve IVG superior na potência 6CH, diferindo do 20CH, que apresentou TMG superior, mostrando atraso na germinação. A utilização de *Kali carbonicum* auxilia no aumento da taxa de germinação e Tempo Médio de Germinação nas sementes de *Hypericum perforatum* L.

2.3 INTRODUÇÃO

A espécie *Hypericum perforatum* L., conhecida como erva-de-são-joão, tem sido amplamente estudada e utilizada como fitoterápico no tratamento antidepressivo, antitumoral e antioxidante (LINDE, 2009; MAŠKOVIĆ et al., 2011; RUSSO et al., 2013). Bonaterra et al. (2017) relatam que *H. perforatum* apresenta ação citoprotetora, neurotrófica e anti-inflamatória. De acordo com Chiovatto et al. (2011), o uso de *H. perforatum* como fitoterápicos tem proporcionado resultados superiores aos fármacos convencionais comumente receitados, tais como a fluoxetina (cloridrato de fluoxetina).

Plantas de *H. perforatum* apresentam ocorrência natural em regiões temperadas e subtropicais. Crescem e se desenvolvem em solos pobres em nutrientes, arenosos, áridos e rochosos (CRONQUIST, 1981; MOSSBERG; STENBERG, 2010). Entretanto, essa espécie não tem se naturalizado no Brasil, pois não atinge o porte adequado, não floresce e não produz sementes, o que requer medidas interventivas para seu cultivo (FARON et al., 2004). As sementes de *H. perforatum* geram plântulas delicadas e sensíveis as mudanças climáticas e do solo (ARNCKEN, 2000). De acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) para germinação das sementes da espécie, deve-se utilizar a temperatura de 20 °C ou alternadas de 20-30 °C (BRASIL, 2009). No entanto, as recomendações para superação de dormência de sementes da espécie não têm demonstrado resultados satisfatórios (FARON et al., 2004). A temperatura é um dos fatores que apresentam grande influência tanto na porcentagem de germinação quanto na determinação do vigor das plântulas (BEWLEY; BLACK, 1994).

A germinação das sementes e o crescimento de plantas de *H. perforatum* pode estar associado a fatores ambientais, como temperatura, luminosidade e pela manipulação do substrato (CAMPBELL, 1985). A adição de substâncias como ácido sulfúrico, ácido clorídrico e nitrato de potássio tem sido utilizado para incrementar a porcentagem, velocidade e uniformidade de germinação. Faron et al. (2004) avaliando a temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo, observaram que mudanças em fotoperíodo e temperatura influenciam na capacidade germinativa de *H. perforatum*. Fatores como a luminosidade e uso de substâncias para a quebra de dormência podem interferir no poder germinativo de sementes de plantas medicinais em geral (SCALON et al., 2007). Melo, Bortolin e Silva (2016) verificaram que a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas aumentam o potencial germinativo das sementes da planta medicinal *Aster squamatus*. Estudo realizado por Amaro et al. (2012), para quebra de dormência de sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum*), relatam que dos tratamentos utilizados, a pré-embebição a 10 °C por 4 dias resultou na germinação de 60% das sementes.

Sementes do gênero *Hypericum* apresentam baixa capacidade germinativa, devido à inibição química do exsudato presente na cápsula das sementes, causadores da dormência endógena e exógena (MACCHIA; BENVENUTI; ANGELINI, 1983; CIRAK; KEVSEROGLU; AJAN, 2007). Dessa maneira, o uso de facilitadores do processo germinativo, tais como, temperatura ideal; tratamento adequado e não residual; e fotoperíodo tem sido indicado para melhoria do arranque inicial e estabelecimento de plântulas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Para o cultivo de plantas medicinais, protocolos de multiplicação precisam ser seguidos para garantir a integridade dos metabólitos fitomedicinais. Dessa forma, a Instrução Normativa nº 4 do Ministério da Saúde, proíbe a utilização de agrotóxicos para o cultivo de plantas fitoterápicas (BRASIL, 2014a). A utilização de práticas adequadas é necessária no processo de viabilização de plântulas por germinação de sementes, multiplicação de explantes e tratamento fitossanitário (NUNES et al., 2018). Neste sentido, o uso de altas diluições dinamizadas traz a perspectiva para um manejo de plantas medicinais de forma não residual, mantendo os atributos fotoquímicos da planta (CAPRA, 2014). Considerado um recurso de fácil implementação, preparados em altas diluições dinamizadas são amplamente sustentados pela literatura, com respostas positivas na performance fitoterápica de plantas medicinais (FONSECA; CASALI; CECON, 2006).

Altas diluições dinamizadas são previstas na legislação da produção orgânica, pela Instrução Normativa nº 17 de 2014 pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014b). Donadon et al. (2011), utilizando substâncias em altas diluições para germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*), comprovaram que o preparado *Arnica montana* aumentou em 5,9% a germinação quando comparado com a água destilada. Barbosa et al. (2012), avaliando o efeito de preparados homeopáticos sobre a germinação de brócolis (*Brassica oleracea* var. itálica), relatam que *Phosphorus* se mostrou eficiente para uma rápida e regular germinação das sementes. Portanto, avaliar as condições mínimas de temperatura associada a aplicação de substâncias em altas diluições que promovam a germinação rápida e uniforme das sementes de *H. perforatum* é extremamente importante para que o cultivo desta planta medicinal possa ser implementado a campo e expandido como um cultivo comercial para gerar renda, principalmente para pequenos agricultores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura, de preparados em altas diluições dinamizadas e diferentes centesimais hahnemannianas na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* (L.) em laboratório.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina/EPAGRI – Lages, no período de agosto de 2017 a janeiro de 2018. As sementes de *Hypericum perforatum* utilizadas no teste de germinação foram adquiridas na empresa Feltrin Sementes[®]. De acordo com o fabricante a taxa de germinação das sementes é de 64%.

A pesquisa foi realizada em três etapas distintas. Em cada uma delas, realizou-se dois experimentos. Para todos os bioensaios utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em câmaras de germinação Biochemical Oxygen Demand (BOD), com caixas de poliestireno (Gerbox[®]) 11 x 11 cm, com capacidade para 250 ml, em escuro contínuo. Optou-se por trabalhar com escuro contínuo pela falta de experimentos realizados desta maneira, possibilitando assim, maior entendimento sobre o comportamento da espécie em relação à sua germinação. Para instalação dos experimentos as sementes foram contadas e separadas com auxílio de pinça entomológica.

A primeira etapa consistiu em determinar a temperatura ideal para germinação da espécie (Temperatura); na segunda avaliou-se diferentes preparados homeopáticos (Altas diluições dinamizadas); e na terceira testou-se diferentes diluições em centesimais hahnemannianas (CH) do preparado homeopático *Kali carbonicum*.

2.4.1 Temperatura

Foram utilizadas três temperaturas: 20, 25 e 30 °C (FARON et al., 2004; RBG KEW, 2008) com 20 repetições de 50 sementes para cada Gerbox[®], totalizando 1000 sementes por temperatura. As sementes foram dispostas sobre papel Germitest[®], e umedecidas utilizando água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso (g) do papel seco (BRASIL, 2009). As seguintes variáveis foram analisadas: porcentagem de germinação, Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas com cotilédones. As avaliações iniciaram a partir do sétimo dia de semeadura, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula, considerando pelo menos dois centímetros de comprimento durante este período. Foram realizadas contagens diárias sobre as sementes germinadas para determinar ao final do experimento (19 dias) o IVG, TMG e porcentagem de germinação.

2.4.2 Altas diluições dinamizadas

A condução dos bioensaios com as altas diluições dinamizadas considerou a temperatura ótima de 25 °C, evidenciada na análise de dados do experimento com diferentes temperaturas. Foram testados cinco tratamentos, na metodologia duplo cego, ou seja, sem identificar nenhum dos tratamentos. Em delineamento completamente casualizado utilizou-se quatro preparados homeopáticos, sendo *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra*, na 12CH, e água destilada não dinamizada como controle. Determinou-se utilizar água destilada não dinamizada, pois dinamizar até mesmo a água pode modificar as propriedades físico-químicas desta, tornando-se um novo preparado em alta diluição (FIGUEIREDO et al., 2012).

Para seleção dos preparados homeopáticos, utilizou-se linguagem repertorial correlata às plantas em consulta a matéria médica por meio das principais características apresentadas pelo *Hypericum perforatum*, tais como: sensibilidade ao frio, necessidade de água constante e luz, fotossensibilidade, fragilidade e capacidade germinativa baixa (Figura 3).

Figura 3 – Repertorização com software Homeopro[®] (matéria médica homeopática para humanos).

| Repertorizacao anonima | | | | | | |
|--|-----|-----|---|---|---|--------|
| ----- | | | | | | |
| 1-SENSIVEL_ar frio (sensitive to cold air) (G- | 70r | | | | | |
| 2-BEBIDA_agua_agg. (water agg.) | - | 21r | | | | |
| 3-DESEJO_luz (desire for light) | - | 29r | | | | |
| 4-SENSIVEL_luz (sensitive to light) | - | 31r | | | | |
| 5-IDENTIDADE_fragil (sensation of being frail- | 5r | | | | | |
| ----- | | | | | | |
| Sintomas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | St/Pts |
| ----- | | | | | | |
| bell | 2 | - | 3 | 4 | - | 03/009 |
| phos | 2 | - | 3 | 3 | - | 03/008 |
| acon | 1 | - | 2 | 3 | - | 03/006 |
| sil | 4 | - | 1 | - | 1 | 03/006 |
| ars | 2 | 1 | - | 2 | - | 03/005 |
| nat-m | 2 | - | 1 | 1 | - | 03/004 |
| sulph | 1 | 1 | 1 | - | - | 03/003 |
| nux-v | 3 | - | - | 3 | - | 02/006 |
| gels | - | - | 3 | - | 1 | 02/004 |
| stram | - | - | 3 | 1 | - | 02/004 |
| stront-c | 2 | - | 2 | - | - | 02/004 |
| calc | - | 1 | 2 | - | - | 02/003 |
| carb-an | 2 | - | 1 | - | - | 02/003 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Com as matérias médicas listadas de acordo com a pontuação somado pelo software Homeopro[®], utilizou-se o livro de matérias médicas para humanos de Lathoud (2010) e Ribeiro

Filho (2014) para determinar quais as homeopatias que melhor se aproximavam ao nível de similitude de *H. perforatum*, nas características priorizadas como núcleo do organismo a ser tratado. Para a característica capacidade germinativa baixa foi utilizado o livro de Tichavský (2009). Entretanto, foi considerado também as demais descrições de característica da planta, a fim de identificar o melhor preparado homeopático a ser utilizado. Tichavský em seu livro “Homeopatia para las plantas” leva em consideração principalmente as modalidades de agravamento e melhora, bem como, os aspectos terapêuticos correlacionados aos processos metabólicos e morfológicos, justamente por ser direcionado à agricultura e não a matéria médica para humanos. Deste modo, pela repertorização do software Homeopro[®] e os livros de matéria médica homeopática, foi possível chegar aos preparados homeopáticos *Kali carbonicum*, *Phosphorus*, *Silicea terra* e *Natrum muriaticum*.

Os preparados homeopáticos foram adquiridos em farmácia de manipulação especializada em homeopatia na potência 6CH (sexta ordem de diluição centesimal hahnemanniana) conforme descrito na Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011). Para o experimento, utilizou-se álcool 70% para obtenção da dinamização 10CH e posteriormente para obtenção da dinamização 11CH e quando elevados para a 12CH empregou-se somente água destilada. Essa metodologia foi adotada para que não houvesse interferência do álcool sobre a germinação das sementes de *H. perforatum*. Dessa forma, todos os preparados homeopáticos foram utilizados na dinamização 12CH.

Para cada tratamento foram realizadas 4 repetições, cada qual constituída por uma caixa de poliestireno (Gerbox[®]), contendo 50 sementes de *H. perforatum*. Foram dispensados 20 ml do preparado homeopático em placas de Petri e as sementes foram imersas por 15 minutos na solução, posteriormente sendo dispostas sobre o papel Germitest[®] umedecido com água destilada em 2,5 vezes o peso (g) do papel seco. O tempo de imersão foi determinado a partir de teste piloto utilizando diferentes períodos de imersão. Para o tratamento com água destilada não se realizou imersão da semente, sendo apenas disposta no papel Germitest[®] já umedecido. Optou-se por não realizar imersão em água destilada por resultados obtidos a partir de testes pilotos.

Após a distribuição de sementes (Figura 4) e identificação dos tratamentos, as caixas Gerbox[®] foram dispostas em bandejas fechadas com sacos plásticos, para isolar cada tratamento e manter a umidade dentro das bandejas. As bandejas, contendo as caixas Gerbox[®], foram transferidas para o interior de câmara de germinação BOD, com a temperatura ajustada de acordo com os resultados do primeiro teste (25 °C).

Foram realizadas avaliações de contagem diária até o 18º dia e ao final determinou-se o IVG e TMG e a porcentagem final da germinação.

Figura 4 – Sementes de *Hypericum perforatum* dispostas em caixa Gerbox[®], constituindo uma unidade experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

2.4.3 Centesimal Hahnemanniana

Por meio dos resultados obtidos com diferentes preparados homeopáticos, selecionou-se a homeopatia *Kali carbonicum* e avaliou-se diferentes potencias – graus de dinamizações na ordem centesimal hahnemanniana (CH) – a fim de identificar se haveria alteração sobre a taxa de germinação das sementes utilizando diferentes dinamizações. Utilizou-se as dinamizações 6, 12, 20 e 30CH e o controle com água destilada não dinamizada. O preparado homeopático *Kali carbonicum* foi adquirido em farmácia de manipulação, assim como descrito no item anterior.

Para cada tratamento, foram realizadas 4 repetições, contendo 50 sementes de *H. perforatum*. As sementes ficaram em imersão durante 15 minutos no preparado homeopático, sendo dispostas posteriormente em papel Germitest[®] já umedecidos com água destilada em 2,5 vezes o peso (g) do papel seco, dentro das caixas Gerbox[®]. As caixas Gerbox[®] foram dispostas em bandejas fechadas com sacos plásticos e transferidas para o interior de câmara de germinação BOD, com a temperatura de 25 °C e em escuro contínuo. As avaliações consistiram

em contagem diária durante 18 dias e ao final determinou-se o IVG, TMG e porcentagem final da germinação.

2.4.4 Análise estatística

Todos os bioensaios foram realizados em duplicata. Os dados do experimento um e dois foram analisados em conjunto, comparando se houve ou não interação entre os tratamentos e a realização do experimento. Para calcular o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi utilizado o modelo proposto por Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n} \quad (1)$$

Onde: G_1, G_2, G_n = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N_1, N_2, N_n = número de semanas desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Para o Tempo Médio de Germinação (TMG) utilizou-se o cálculo de Labouriau (1983):

$$TMG = \frac{\sum ni \cdot ti}{\sum ni} \quad (2)$$

Onde: ni = número de sementes germinadas num intervalo de tempo e ti = intervalo de tempo de germinação.

Para análise dos dados foi utilizada a análise de variância (teste F), sendo verificadas as pressuposições de homocedasticidade (teste de Bartlett) e normalidade (teste Shapiro-Wilk). Nos casos em que as pressuposições do modelo não foram satisfeitas utilizou-se a transformação proposta por Box-Cox, aplicando o lambda ótimo para transformação. Quando observado efeito significativo dos tratamentos realizou-se a comparação de médias por meio do teste de Tukey. Para análise dos dados de germinação no decorrer do tempo, coletados no teste com diferentes preparados homeopáticos, utilizou-se o modelo binomial com parâmetro de dispersão (quasibinomial) e função de ligação *probit*. Todos os dados foram analisados com o auxílio do ambiente R (R Core Team, 2017) considerando o nível de 5% de significância.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Teste de germinação de sementes submetidas a diferentes temperaturas

A porcentagem de germinação, número de plântulas com cotilédones e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foram superiores na temperatura de 25 °C em comparação à 20 e 30 °C. O Tempo Médio de Germinação (TMG) foi maior para a temperatura de 20 °C do que as demais temperaturas, pois o tempo de germinação é maior (16,84 dias). Não houve diferença estatística entre as temperaturas 25° e 30 °C para TMG (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (G%), Índice de Velocidade da Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas com cotilédones de sementes de *Hypericum perforatum* submetidas a diferentes temperaturas em laboratório. Lages/SC, 2018.

| Temperaturas (°C) | Germinação (G%) | IVG | TMG (dias) | Plântulas com cotilédones (n°) |
|-------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 20 | 26 ± 3,51 b | 3,75 ± 0,58 b | 16,84 ± 0,12 a | 7,41 ± 1,21 b |
| 25 | 63 ± 2,10 a | 20,59 ± 0,84 a | 14,39 ± 0,04 b | 26,01 ± 1,06 a |
| 30 | 18 ± 2,90 b | 3,94 ± 0,79 b | 15,06 ± 0,82 b | 7,16 ± 1,41 b |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5% de significância). ± Erro padrão.

Os dados demonstram que a temperatura de 25 °C em regime de escuro contínuo é eficiente na germinação da semente de *H. perforatum*. Faron et al. (2004), realizando testes utilizando as temperaturas de 20, 25, 30 °C e alternadas 20-30 °C, com e sem fotoperíodo, obtiveram resultados melhores para temperatura alternada e com fotoperíodo de 16/8 horas. De acordo com Campbell (1985), as sementes de *H. perforatum* são fisiologicamente inativas e temperaturas altas e/ou escuridão total poderiam impedir a germinação. No experimento, nota-se que o escuro contínuo não foi o fator limitante para a germinação das sementes, sendo que encontrar a temperatura ideal pode proporcionar maiores ou menores taxas sobre a germinação.

Testes de germinação com sementes de *H. perforatum* realizado por Pérez-García et al. (2006), utilizando 15 e 25 °C com fotoperíodo de 16/8 horas, mostraram que ao final das avaliações a variação na porcentagem da germinação foi entre 6 a 98%, e a taxa de germinação entre 6 a 23 dias. Dessa forma, não havendo homogeneidade quanto ao tempo e porcentagem de germinação das sementes de *Hypericum perforatum*.

As temperaturas de 20 e 30 °C não foram eficientes para germinação da semente, o que pode estar associado a dormência destas. De acordo com Bewley e Black (1994), a dormência pode ser considerada o fracasso de uma semente intacta viável para completar a germinação quando submetida a condições não favoráveis a esta. O Royal Botanic Gardens (RBG KEW, 2008) relata que de 85 a 100% da germinação de *Hypericum perforatum* ocorre em temperaturas de 15-26 °C.

Por se tratar de uma semente que apresenta dormência endógena e exógena, a variação entre as taxas de germinação é muito comum, conseqüentemente, atuando negativamente sobre a produção de mudas de *H. perforatum* (CIRAK; AYAN; KEYSEROGLU, 2004). Por ser uma semente extremamente pequena e frágil, a manipulação da mesma é dificultada, levando facilmente a perda de sementes. A germinação das sementes iniciou a partir do 7º dia de experimento, após o rompimento do hilo. Com o rompimento do hilo o hipocótilo inicia o crescimento juntamente com a radícula, sendo que ambos são estruturas fisiológicas bastante frágeis e com crescimento lento. Com o aumento de tamanho da radícula, há a formação de raízes secundárias, que iniciou a partir do 13º dia (Figura 5).

Figura 5 - Fisiologia da semente de *Hypericum perforatum* durante o processo de germinação:
A) Semente; B) Rompimento do Hilo; C) Surgimento de Hipocótilo; D) Radícula e formação de raízes secundárias.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Na extremidade apical ao crescimento da radícula surgem pequenos cotilédones, fazendo com que o envoltório da semente caia. Após alguns dias observou-se formação do primeiro par de folhas (Figura 6).

Figura 6 – Surgimento de cotilédones em *Hypericum perforatum*.



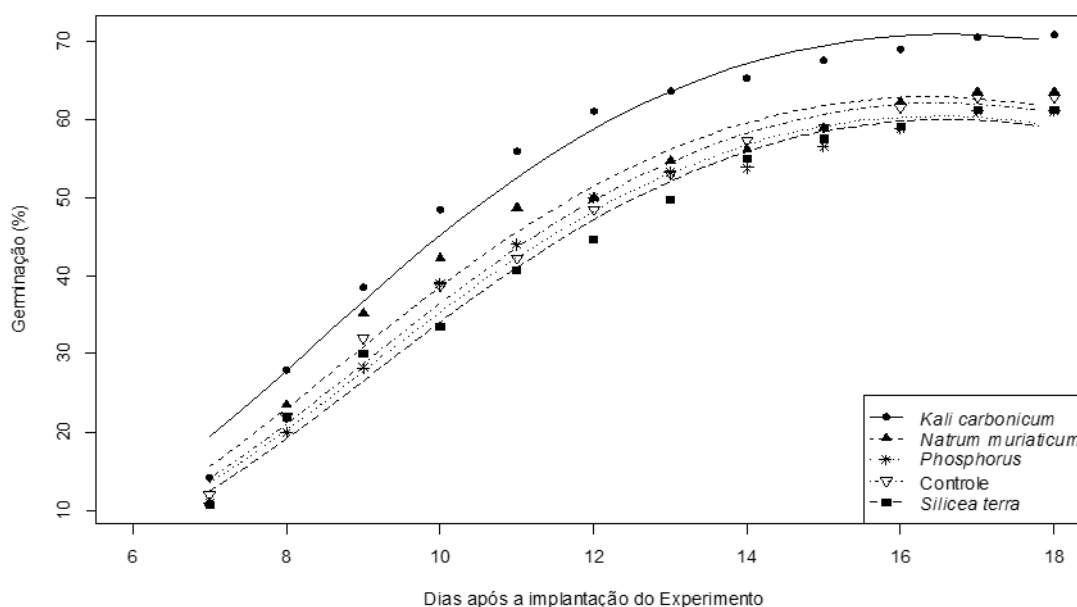
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Neste estudo, a temperatura de 25 °C foi a melhor condição encontrada para o aumento de cotilédones viáveis, refletindo sobre uma maior taxa no estabelecimento dessas estruturas (Tabela 1). A avaliação no número de cotilédones é importante, pois estas são estruturas morfológicas que armazenam os nutrientes que auxiliam o processo germinativo, sendo essenciais para o desenvolvimento inicial da plântula, para que posteriormente dê início a fotossíntese e assim, leve ao desenvolvimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.5.2 Teste de germinação de sementes submetidas a diferentes preparados homeopáticos

O preparado homeopático *Kali carbonicum* atuou de maneira positiva sobre a porcentagem de germinação das sementes de *H. perforatum*, atingindo 70,75% após 18 dias. O arranque inicial da germinação se mostrou promissor com *Kali carbonicum* e manteve-se à frente durante todo o tempo de germinação. O preparado homeopático *Natrum muriaticum* (63,50%) não diferiu do controle (62,75%) na porcentagem de germinação, mas diferiu de *Phosphorus* (61,00%) e de *Silicea terra* (61,25%) (Figura 7).

Figura 7 - Porcentagem de germinação da semente de *Hypericum perforatum* submetidos a diferentes preparados homeopáticos na dinamização 12 CH.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Mesmo atuando sobre a porcentagem de germinação, *Kali carbonicum* não diferiu dos tratamentos *Natrum muriaticum* e o controle com água destilada quanto ao IVG, no entanto, diferiu de *Phosphorus* e *Silicea terra*, que apresentaram menores índices. Para o TMG os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 2).

Tabela 2 – Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e plântulas com cotilédones de sementes de *Hypericum perforatum* submetidas ao tratamento com diferentes preparados homeopáticos na 12CH. Lages/SC, 2018.

| Tratamento | IVG | TMG (dias) | Plântulas com cotilédones ¹ (n°) | Plântulas com cotilédones ² (n°) |
|------------|-----------------|----------------------------|--|--|
| Kali-c | 25,64 ± 0,73 a | 13,53 ± 0,06 ^{ns} | 13,25 ± 2,56 ab | 8,25 ± 0,48 ^{ns} |
| Nat-m | 22,28 ± 0,95 ab | 13,59 ± 0,06 | 14,00 ± 0,56 a | 3,50 ± 1,19 |
| Phos | 20,81 ± 1,22 b | 13,67 ± 0,03 | 9,00 ± 0,71 ab | 4,25 ± 0,48 |
| Sil | 20,34 ± 1,40 b | 13,72 ± 0,08 | 10,50 ± 3,23 ab | 5,25 ± 1,65 |
| Controle | 21,45 ± 0,72 ab | 13,67 ± 0,05 | 5,00 ± 0,82 b | 6,00 ± 1,00 |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si teste de Tukey (5% de significância). ± Erro padrão. Kali-c = *Kali carbonicum*; Nat-m = *Natrum muriaticum*; Phos = *Phosphorus*; Sil = *Silicea terra*. ¹ Bioensaio 1. ² Bioensaio 2. Para as variáveis IVG e TMG a interação entre tratamentos e experimento foi não significativa. ns = não significativo.

Estudos têm se mostrado promissores quanto a utilização de preparados homeopáticos na germinação de sementes de várias espécies de plantas. Bonfim et al. (2010), utilizando os

preparados homeopáticos *Alumina* e *Calcarea carbonica* na 6 e 12CH na germinação e vigor de semente de alface (*Lactuca sativa*) submetidas a toxicidade de alumínio, obtiveram resultado positivo sobre a germinação das sementes para ambos os preparados. Conforme Andrade et al. (2012), o uso de preparados homeopáticos pode interferir no padrão fisiológico vegetal e assim, apresentar efeitos potenciais de resposta, tanto positivo como negativo. No estudo, verificou-se que os tratamentos utilizados não responderam da mesma forma no IVG, o que mostra que a planta de *H. perforatum* é sensível ao uso de preparados homeopáticos e a aplicação desta atua diretamente na capacidade germinativa da planta.

Para os resultados da porcentagem de germinação de sementes de *H. perforatum* tratadas com *Kali carbonicum*, Tichavský (2009) relata que este preparado homeopático é um medicamento que influencia em múltiplas funções vitais dentro da planta, tais como aumentar a eficiência de nitrogênio e otimizar a concentração salina das células, devido ao fato de que o potássio é um dos elementos primários na nutrição vegetal.

Para o número de plântulas com cotilédones, os experimentos um e dois mostraram interação com tratamento, dessa maneira, os dados são apresentados decompostos em duas colunas. No experimento um, o tratamento *Natrum muriaticum* diferiu do controle, no entanto, não diferiu dos demais tratamentos. Nos demais tratamentos não houve diferença com o controle. No experimento dois, nenhum tratamento mostrou maior eficiência quanto ao estabelecimento de cotilédones (Tabela 2).

2.5.3 Teste de germinação de sementes submetidas ao preparado *Kali carbonicum*

O preparado homeopático *Kali carbonicum* nas diferentes centesimais hahnemannianas não apresentou diferença sobre a porcentagem de germinação das sementes de *Hypericum perforatum*. No IVG, *Kali carbonicum* na 6CH foi superior a 20CH, mas não diferindo dos demais tratamentos. Para a variável TMG, o preparado na 20CH foi superior aos demais, mostrando assim, atraso na germinação das sementes da espécie (Tabela 3).

Tabela 3 - Influência das diferentes ordens de dinamizações centesimais hahnemannianas (CH) do preparado homeopático *Kali carbonicum* na porcentagem de germinação (G%), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Tempo Médio de Germinação de sementes de *Hypericum perforatum*.

| Tratamento | Germinação (%) | IVG | TMG (dias) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|----------------|
| <i>Kali carbonicum</i> 6CH | 71 ± 2,50 ^{ns} | 21,44 ± 0,90 a | 13,79 ± 0,03 b |
| <i>Kali carbonicum</i> 12CH | 68 ± 3,37 | 19,76 ± 1,09 ab | 13,94 ± 0,06 b |
| <i>Kali carbonicum</i> 20CH | 64 ± 3,40 | 14,95 ± 1,11 b | 14,59 ± 0,09 a |
| <i>Kali carbonicum</i> 30CH | 65 ± 2,08 | 17,63 ± 0,64 ab | 14,12 ± 0,05 b |
| Controle | 64 ± 2,21 | 18,10 ± 2,08 ab | 13,95 ± 0,18 b |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (5% de significância). ± Erro padrão. Para as variáveis IVG e TMG a interação entre tratamentos e experimento foi não significativa. ns = não significativo.

Os preparados homeopáticos podem ser utilizados nas ordens de diluição decimal, centesimal ou cinquenta milesimal, e cada uma pode apresentar diferentes respostas biológicas (CESAR, 2003; GIESEL et al., 2012). Para as centesimais hahnemannianas, considera-se que 6CH a 12CH são dinamizações baixas que atuarão principalmente no nível físico. No entanto, para humanos de 12CH até 200CH encontram-se as dinamizações médias que podem atingir aspectos mentais (TICHAVSKÝ, 2009). Panda, Mohanty e Dhal (2013), utilizando os preparados homeopáticos *Arsenicum album* e *Baryta carbonica* em centesimais hahnemannianas diferentes (8CH, 32CH e 202CH) sobre a germinação, crescimento e atividade fotossintética de plântulas de ervilha (*Pisum sativum*), relatam efeito estimulante significativo no crescimento e atividade fotossintética na potência 202CH em comparação as demais, inclusive ao controle. Silva et al. (2012) avaliaram as dinamizações de 6, 12, 18, 24 e 30CH de *Pulsatilla nigricans* no vigor de sementes de soja (*Glycine max*) submetidas ao envelhecimento acelerado. Dados obtidos mostraram que as dinamizações 12, 18 e 30CH apresentaram maior comprimento da parte aérea, enquanto que o comprimento total de plântulas foi reduzido quando utilizado as diluições 6 e 24CH. Silva et al. (2018) utilizando *Kali carbonicum*, *Silicea terra*, *Calcarea phosphorica*, *Phosphorus* e *Belladonna* na 12CH para germinação das sementes de soja, relatam aumento no crescimento de hipocótilo com a utilização de *Kali carbonicum* e *Silicea terra* em relação às demais.

A porcentagem de germinação não foi alterada pela utilização das diferentes CH, contudo, o Tempo Médio de Germinação foi maior (14,59 dias) quando utilizado o preparado *Kali carbonicum* na 20CH, assim interferindo na homogeneidade da germinação das sementes e estabelecimento de plântulas. O Índice de Velocidade de Germinação das sementes de *H.*

perforatum com *Kali carbonicum* na 20CH (14,95) diferiu significativamente em relação ao preparado na 6CH (21,44).

Os resultados encontrados em outras pesquisas apontam que os preparados homeopáticos atuaram com efeito resposta de forma ondulatória (BONATO, 2004). Portanto, a utilização de diferentes centesimais para a mesma matéria médica homeopática pode resultar em diferentes resultados sobre a mesma planta (GONÇALVES; BOFF; BOFF, 2010). Na pesquisa, percebeu-se diferença considerável entre as dinamizações centesimais testadas, mostrando assim, que o resultado poderá ser influenciado tanto pela escolha da homeopatia quanto pela dinamização utilizada.

2.6 CONCLUSÃO

A temperatura de 25 °C proporcionou maior estímulo na germinação das sementes de *Hypericum perforatum* em relação às demais temperaturas testadas.

O preparado homeopático *Kali carbonicum* na 12CH apresentou influência na porcentagem de germinação para 70,75%, aumentando em 8% em relação ao controle (62,75%).

Kali carbonicum na 6CH apresentou melhores resultados quanto ao Índice de Velocidade de Germinação em relação à dinamização 20CH.

O preparado homeopático *Kali carbonicum* nas dinamizações 6, 12 e 30CH podem auxiliar na quebra de dormência nas sementes de *Hypericum perforatum*, bem como, no Tempo Médio de Germinação.

3 CAPÍTULO 2 – CRESCIMENTO VEGETATIVO DE PLANTAS DE *HYPERICUM PERFORATUM* L. EM DIFERENTES ÉPOCAS DE CULTIVO E SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS

3.1 RESUMO

Hypericum perforatum é uma espécie fitoterápica utilizada no tratamento antidepressivo. Nativa da Europa, Ásia e norte da África está sendo aclimatizada em vários outros países. No Brasil, porém, não atinge porte adequado e não floresce, inviabilizando a produção de mudas. Por se tratar de uma planta medicinal, seu cultivo deve seguir a Instrução Normativa (IN) nº 4 de 2014 do Ministério da Saúde, onde determina a proibição do uso de agrotóxicos para produção de fitoterápicos. Preparados em altas diluições dinamizadas/homeopáticos têm ação em processos biológicos de plantas, sem gerar toxicidade ao homem e nem resíduos ao meio ambiente. O objetivo da pesquisa foi avaliar a atuação de preparados homeopáticos sobre o crescimento vegetativo do *Hypericum perforatum*. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, iniciando a produção de mudas em sala climatizada no Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal e posteriormente transplantando para casa de vegetação na Estação Experimental da EPAGRI de Lages/SC. O Exp.-Primavera/verão foi conduzido no período de outubro de 2017 a janeiro de 2018 e o Exp.-Verão/outono de fevereiro a maio de 2018. Para ambos os experimentos se utilizou a mesma metodologia de cultivo e avaliações, alterando-se somente a época de plantio e colheita. Inicialmente as sementes foram semeadas em sala climatizada com 25 °C e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, em substrato com vermiculita e terra preta na proporção de 2:1. A parcela experimental foi composta de 12 plantas com 5 tratamentos e 4 repetições. Foram utilizados os preparados homeopáticos *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra* na 12CH, e água destilada como controle. Após a emergência das sementes foram iniciadas as aplicações semanais dos tratamentos diretamente no substrato, sendo dispensado 1 ml por célula. Todas as plantas foram regadas com 200 ml de água a cada dois dias. Após as plantas atingirem porte adequado, realizou-se transplante em vasos contendo vermiculita, solo preto e esterco de ovelha (1:1:1). A parcela experimental para a casa de vegetação foi constituída por 4 plantas por vaso e a aplicação dos tratamentos continuou semanalmente por um mês. Durante 30 dias foram efetuadas duas avaliações semanais do crescimento do ramo principal e 30 dias após o transplante avaliou-se o comprimento da raiz, altura das plantas, ramificações, peso de massa fresca aérea e raiz e massa seca sem raiz. Para análise de dados foi utilizado o ambiente R, utilizando teste de Tukey a 5% de significância. O crescimento semanal para o Exp.-Primavera/verão não foi acelerado pela utilização dos preparados homeopáticos. Entretanto, no Exp.-Verão/outono, *Natrum muriaticum* 12CH mostrou-se superior (30,17 cm) em relação ao controle (26,22 cm), mas não diferindo de *Kali carbonicum* (28,91 cm) e *Phosphorus* (28,04 cm). Os preparados homeopáticos utilizados não promoveram maiores índices nas variáveis analisadas, assim, não diferindo do controle. No Exp.-Primavera/verão todas as variáveis foram superiores ao Exp.-Verão/outono. O crescimento vegetativo de *H. perforatum* foi influenciado principalmente pela época de cultivo, visto que a planta necessita de temperaturas mais elevadas e maior tempo de radiação solar. Assim, o cultivo na primavera resulta em maior número de ramificações (24,62 cm), altura das plantas (42,32 cm) e rendimento de biomassa (2,67 g).

3.2 INTRODUÇÃO

Hypericum perforatum é uma espécie fitoterápica nativa da Europa, Ásia e norte da África, que pode se reproduzir abundantemente nesses países em locais de pastagens, beira de estradas e rodovias e ambientes perturbados pela ação humana (CROMPTON et al., 1998; DEHKORDI; YADEGARI; HAMED, 2015). No entanto, a adaptação e o cultivo da espécie no Brasil, ainda é ineficaz, visto que a planta não atinge o porte adequado e não floresce (FARON et al., 2004). Na Alemanha, *H. perforatum* é prescrito vinte vezes mais que a fluoxetina no tratamento da depressão, sendo também um dos fitoterápicos mais utilizados nos Estados Unidos (NCCAM, 1999). Devido a taxa relativamente baixa de efeitos colaterais e alta tolerabilidade dos pacientes, há grande aceitação no uso da espécie para o tratamento de depressão (TEWARI et al., 2008).

O mercado de fitoterápicos no mundo destaca-se com cerca de US\$ 21,7 bilhões ao ano, sendo estimado somente no Brasil US\$ 160 milhões, tornando-se um mercado alvo para muitas famílias (CARVALHO et al., 2008). Para realização de cultivo de plantas medicinais no Brasil, a Instrução Normativa nº 4 de 2014 do Ministério da Saúde, determina que não é permitindo a utilização de agrotóxicos sendo necessário que os agricultores considerem outras estratégias para o cultivo e produção de plantas medicinais (BRASIL, 2014a). Deste modo, a utilização de tratamentos com altas diluições dinamizadas pode ser incluída no cultivo de plantas medicinais.

O emprego de preparados homeopáticos na agricultura tem mostrado efeito positivo sobre diferentes culturas, promovendo tanto o crescimento vegetativo como o incremento de biomassa (BONATO; PROENÇA; REIS, 2009). Com objetivo de resguardar o ambiente dos impactos decorrentes de agrotóxicos, o uso da homeopatia para produção orgânica é regulamentado através da Instrução Normativa nº 17/2014 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2014b).

Os preparados homeopáticos atuam nos processos biológicos das plantas, sendo uma opção para o cultivo ecológico, pois não geram toxicidade (ESPINOZA et al., 2001). A atuação dos preparados sob o crescimento vegetativo e incremento de biomassa tem sido relatado em diversos estudos. Costa et al. (2018), utilizando preparados homeopáticos no desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) demonstram que o uso de *Carbo vegetabilis* influenciou positivamente no crescimento radicular, desenvolvimento de massa verde e peso total da alface quando comparado ao controle. Gonçalves, Boff e Vieira Neto (2018) testando as altas diluições

dinamizadas, relatam que a altura das plantas e massa fresca das folhas de rúcula (*Eruca sativa*) tiveram incremento quando comparado à testemunha.

Considerando a produção ecológica e a necessidade de estabelecimento de plantas de *Hypericum perforatum* no Brasil, o objetivo da pesquisa foi avaliar a atuação de tratamentos com altas diluições dinamizadas sobre o crescimento vegetativo dessa espécie.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada no Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal e na casa de vegetação na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina/EPAGRI – Lages, no período de outubro de 2017 a junho de 2018. O município de Lages apresenta clima quente e temperado, classificado como Cfb. A temperatura média é de 16,6 °C, com pluviosidade média anual de 1.441 mm. Foram realizados dois experimentos, separadamente, no período de outubro/2017 a junho/2018. O Exp.-Primavera/verão foi conduzido nos meses de outubro, novembro, dezembro de 2017 e janeiro de 2018 e o Exp.-Verão/outono nos meses de fevereiro, março, abril e maio de 2018.

As sementes de *Hypericum perforatum* foram adquiridas da empresa Feltrin Sementes[®], sendo dispostas em bandeja sementeira com 24 células preenchidas com vermiculita e terra preta, na proporção de 2:1. O delineamento experimental foi o casualizado em blocos. Após a semeadura, as bandejas foram separadas em blocos e transferidas para sala climatizada a 25 °C com fotoperíodo de 16/8h, sob intensidade luminosa de lâmpadas de LED com 2.338 LUX. A parcela experimental foi composta por 12 plantas em sementeira, com 5 tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 plantas por tratamento (Figura 8). Utilizou-se bandeja plástica embaixo de cada sementeira, regando com 200 ml de água a cada dois dias. Semanalmente, foram realizados rodízios entre as bandejas para diminuir possíveis influências dentro da sala climatizada. Após a emergência das sementes (15 dias), iniciou-se a aplicação dos tratamentos com preparados homeopáticos.

Figura 8 – Parcelas experimentais em sala climatizada de plantas de *Hypericum perforatum*, dispostas de acordo com rodízio semanal para aplicação dos tratamentos com altas diluições dinamizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Para a escolha dos preparados foi realizado repertorização sobre as características da planta, tais como: necessidade de grande quantidade de água em períodos curtos, sensibilidade ao frio, fragilidade e fotossensibilidade (Capítulo 1, p. 32-33). Foram utilizados os preparados homeopáticos *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra*, todos na 12 CH (décima segunda ordem de diluição centesimal hahnemanniana). As matrizes dos preparados homeopáticos foram adquiridas em farmácia de manipulação especializada em homeopatia na potência 6CH (sexta ordem de diluição centesimal hahnemanniana). Para o experimento, conforme descrito na Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011), utilizou-se álcool 70% para obtenção da dinamização 10CH e posteriormente para obtenção da dinamização 11CH e quando elevados para a 12CH utilizou-se somente água destilada.

Cada preparado homeopático foi preparado em frascos, contendo 60 ml. Foram realizadas aplicações semanais destes, totalizando oito aplicações ao final do experimento. Para a aplicação foi utilizado Transferpette® (100-1000uL), liberando 1 ml por célula da sementeira. A aplicação do preparado homeopático foi realizada diretamente no solo, reduzindo assim, possíveis interferências, tal como, a contaminação entre tratamentos e aumentando a concentração na raiz da planta.

Seis semanas após a sementeira na sala climatizada, realizou-se o transplante das plantas para vaso na casa de vegetação, visto que estas já possuíam tamanho adequado. Foram utilizados vasos de 8,7 litros, compostos de vermiculita, solo preto e esterco de ovelha na

proporção de 1:1:1. Acrescentou-se 195 gramas de fosfato natural para o total de 360 litros de composto utilizado. As plantas foram transplantadas para os vasos, sendo dispostas 4 plantas por vaso. As aplicações continuaram semanalmente, dispensados no solo mantendo-se 1 ml por planta, totalizando 4 ml por vaso. As plantas continuaram na casa de vegetação por mais 30 dias, até serem realizadas mais quatro aplicações.

3.3.1 Avaliações

Foram realizadas duas avaliações semanais para a altura do ramo principal a partir do momento que todas as sementes haviam germinado na casa climatizada (15 dias). Foi considerada adequada para avaliação as plântulas que apresentassem o par de cotilédones desenvolvidos. Dessa forma, determinou-se avaliar 12 plantas por sementeira com 4 repetições.

Após realização de transplante para vaso em casa de vegetação, manteve-se a avaliação sobre a altura do ramo principal por mais 30 dias, sendo 2 avaliações por semana. Ao todo foram realizadas 17 avaliações para comprimento do ramo principal. Quinze dias após a última avaliação sobre a altura do ramo principal, realizou-se avaliações finais da altura final das plantas, comprimento da raiz, ramificações de cada planta, peso da massa fresca aérea e raiz e massa seca sem raiz.

3.3.2 Análise estatística

Para análise dos dados das variáveis: altura do maior ramo, número de ramificações, comprimento da raiz, massa fresca da parte aérea e raiz, massa seca da parte aérea e massa seca por planta foi utilizada a análise de variância (teste F), sendo verificadas as pressuposições de homocedasticidade (teste de Bartlett) e normalidade (teste Shapiro-Wilk). Em casos onde as pressuposições do modelo não foram satisfeitas utilizou-se a transformação proposta por Box-Cox, aplicando o lambda ótimo para transformação. Quando observado efeito significativo dos tratamentos realizou-se a comparação de médias por meio do teste de Tukey.

Para descrever o comportamento da variável altura no decorrer do tempo utilizou-se o modelo logístico, dado por:

$$y_{ij} = \frac{\beta_{1i}}{\left(1 + e^{\frac{\beta_{2i} - t_j}{\beta_{3i}}}\right)} + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

Em que β_{1i} representa o parâmetro associado a assíntota para o i-ésimo tratamento, β_{2i} é o parâmetro que representa o valor numérico associado ao tempo no ponto de inflexão da curva para o i-ésimo tratamento, nesse ponto o valor da altura será $\frac{\beta_{1i}}{2}$, β_{3i} é o parâmetro de escala associado ao i-ésimo tratamento, t_j é o tempo em dias associado a j-ésima observação, e ϵ_{ij} é o erro associado a j-ésima observação do i-ésimo tratamento. A comparação entre os tratamentos foi realizada por meio dos intervalos de confiança dos parâmetros do modelo.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2017) considerando 5% de significância.

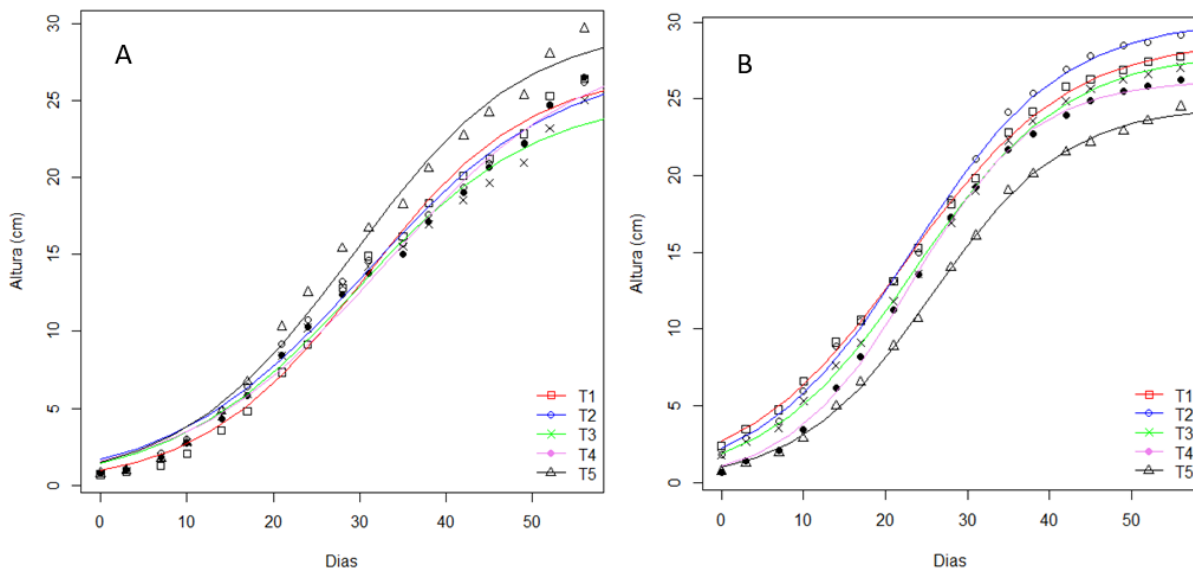
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo em sala climatizada foi essencial para germinação das sementes e estabelecimento de mudas de *Hypericum perforatum*, visto que as sementes da espécie possuem dormência endógena e exógena. Deste modo, realizou-se semeadura em todas as células da sementeira, contudo, delimitou-se utilizar apenas 12 plantas por bandeja, para manter número homogêneo entre as repetições e tratamentos.

De acordo com Rebouças et al. (2015), o cultivo em ambiente protegido é necessário para diversas plantas, sendo considerado uma tecnologia contributiva à modernização da agricultura, atenuando conseqüentemente os danos causados pelas adversidades climáticas. Para o experimento em questão, optou-se por produção de mudas de *H. perforatum* em sala climatizada, visto que esta permitiria melhor regulação de temperatura (25 °C) para germinação das sementes da espécie. A temperatura foi estabelecida por testes realizadas em B.O.D sobre a germinação das sementes (Capítulo 1).

Com avaliações semanais iniciadas na sala climatizada e, posteriormente, passadas à casa de vegetação, verificou-se que o cultivo em diferentes épocas apresenta respostas distintas entre o crescimento e os tratamentos com altas diluições dinamizadas (Figura 9).

Figura 9 – Crescimento semanal do ramo principal de plantas de *Hypericum perforatum* submetido a tratamentos com altas diluições dinamizadas. A) Exp.-Primavera/verão; B) Exp.-Verão/outono.



* T1 - *Kali carbonicum*; T2 - *Natrum muriaticum*; T3 - *Phosphorus*; T4 - Controle; T5 - *Silicea terra*.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O crescimento vegetativo do *H. perforatum* no Exp.-Primavera/verão mostrou-se superior quando as plantas foram tratadas com o preparado homeopático *Silicea terra* em relação as plantas tratadas com *Phosphorus*, todavia, não diferindo dos demais tratamentos. No Exp.-Verão/outono o preparado *Natrum muriaticum* (30,17 cm) e *Kali carbonicum* (28,91 cm) proporcionaram maior crescimento vegetativo, diferindo estatisticamente do controle (26,22 cm) (Figura 9). No Exp.-Primavera/verão o tempo de crescimento não foi influenciado pela utilização dos preparados homeopáticos, enquanto no Exp.-Verão/outono plantas tratadas com *Kali carbonicum* e água destilada apresentam menor tempo para atingir 50% da altura estimada (Tabela 4).

Tabela 4 – Crescimento vegetativo de plantas de *Hypericum perforatum* cultivadas em casa de vegetação e tratadas com diferentes preparados homeopáticos. Lages/SC, 2018.

| Tratamento | β_1 (altura da planta/cm) | β_2 (tempo de crescimento) ** | β_1 (altura da planta/cm) | β_2 (tempo de crescimento) ** |
|------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| | Exp.-Primavera/verão | | Exp.-Verão/outono | |
| Kali-c | 26,96 ab | 30,53 a | 28,91 a | 22,57 b |
| Nat-m | 27,56 ab | 30,62 a | 30,17 a | 23,24 ab |
| Phos | 25,34 b | 29,49 a | 28,04 ab | 23,81 ab |
| Sil | 29,99 a | 29,19 a | 24,53 c | 25,71 a |
| Controle | 28,80 ab | 32,91 a | 26,22 bc | 23,33 b |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro de cada variável, não diferem significativamente entre si (5% de significância). Kali-c = *Kali carbonicum*; Nat-m = *Natrum muriaticum*; Phos = *Phosphorus*; Sil = *Silicea terra*.

**Tempo estimado para a altura das plantas para atingir 50% do crescimento total.

O parâmetro β_1 corresponde à altura (cm) da planta ao decorrer do tempo. O tratamento *Silicea terra* apresentou média superior à *Phosphorus*, mas não diferiu de *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum* e o controle no Exp.-Primavera/verão. Para o Exp.-Verão/outono, *Natrum muriaticum* diferiu de *Silicea terra* e do controle, mas não de *Kali carbonicum* e *Phosphorus*.

O parâmetro β_2 representa o número de dias que a planta atinge 50% da altura estimada pela assíntota. Deste modo, é possível observar que no Exp.-Primavera/verão, as plantas tratadas com *Silicea terra* demoraram em média 4 dias e meio a mais do que as plantas tratadas com *Phosphorus* para atingir 50% da altura estimada (Tabela 4). Para o Exp.-Verão/outono, *Silicea terra* mostrou atuar na altura da planta de forma diferente ao Exp.-Primavera/verão, levando menos tempo para atingir metade do crescimento final comparado aos demais tratamentos.

A altura do maior ramo no Exp.-Primavera/verão foi reduzido quando utilizado os preparados *Kali carbonicum* e *Natrum muriaticum*. *Phosphorus*, *Silicea terra* e o controle apresentaram maiores médias, contudo, somente o controle difere, significativamente, de *Kali carbonicum* e *Natrum muriaticum*. Para o número de ramificações no Exp.-Primavera/verão, *Silicea terra* diferiu de *Natrum muriaticum*, mas não dos demais tratamentos. No Exp.-Verão/outono não houve diferença estatística entre os tratamentos para a altura do maior ramo e número de ramificações (Tabela 5).

Tabela 5 – Altura média do maior ramo e número de ramificações (\pm Erro padrão) apresentado por plantas de *Hypericum perforatum*, tratadas com diferentes preparados homeopáticos e cultivadas em casa de vegetação, Lages/SC, 2018.

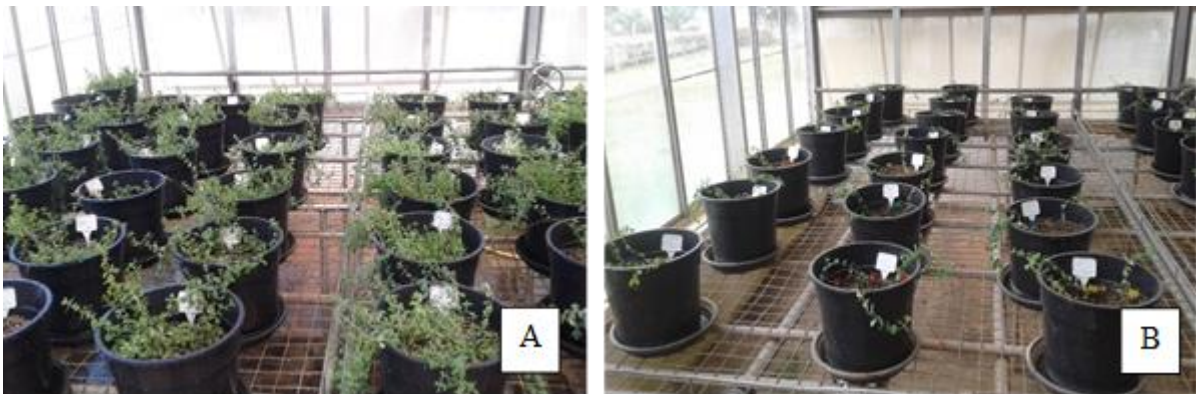
| Tratamento | Altura do maior ramo (cm) | Ramificações (n°) |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Exp.-Primavera/verão | | |
| <i>Kali carbonicum</i> | 37,88 \pm 2,03 b | 21,68 \pm 3,05 ab |
| <i>Natrum muriaticum</i> | 38,33 \pm 2,02 b | 18,92 \pm 1,77 b |
| <i>Phosphorus</i> | 41,92 \pm 2,27 ab | 22,02 \pm 1,63 ab |
| <i>Silicea terra</i> | 44,89 \pm 2,58 ab | 30,85 \pm 3,54 a |
| Controle | 48,53 \pm 2,42 a | 29,21 \pm 3,64 ab |
| Média e erro | 42,32 \pm 1,12 | 24,62 \pm 1,39 |
| Exp.-Verão/outono | | |
| <i>Kali carbonicum</i> | 37,39 \pm 1,20 ^{ns} | 2,00 \pm 0,39 ^{ns} |
| <i>Natrum muriaticum</i> | 39,29 \pm 1,24 | 2,44 \pm 0,38 |
| <i>Phosphorus</i> | 37,88 \pm 1,52 | 1,47 \pm 0,28 |
| <i>Silicea terra</i> | 34,70 \pm 1,59 | 3,17 \pm 0,41 |
| Controle | 36,41 \pm 1,19 | 2,13 \pm 0,60 |
| Média e erro | 37,19 \pm 0,62 | 2,23 \pm 0,20 |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (5% de significância). ns= não significativo.

O número médio de ramificações das plantas de *H. perforatum* no Exp.-Primavera/verão, mostrou-se baixo (18,92) quando foram tratadas com o preparado *Natrum muriaticum*, sendo diferente significativamente daquelas tratadas com *Silicea terra* que apresentaram o maior índice de ramificações (30,85), mas não diferindo do controle e dos demais tratamentos (Tabela 5). De acordo com Tichavský (2009), o preparado *Natrum muriaticum* deve ser utilizado quando a planta apresenta excesso nutricional de fósforo, potássio ou má absorção de nutrientes, enquanto que *Silicea terra* age sobre lentidão ou interrupções de crescimento e atraso ou raquitismo das plantas. De acordo com Casali, Andrade e Duarte (2009), o preparado *Silicea terra* atua em plantas estressadas abioticamente, por déficit hídrico, temperaturas baixas, sobre ataque de fungos, bactérias e pragas.

A diferença no crescimento vegetativo do *H. perforatum* foi percebido visivelmente, principalmente sobre as épocas de plantio e colheita. Ao final das avaliações em casa de vegetação, a espécie apresentou melhor adaptação quando cultivada na primavera (Figura 10).

Figura 10 – Plantas de *Hypericum perforatum* ao final do experimento em casa de vegetação, Lages/SC, 2018. A) Exp.-Primavera/verão; B) Exp.-Verão/outono.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Para o crescimento vegetativo do *H. perforatum* foi essencial o cultivo em casa de vegetação, pois a espécie necessita de temperaturas mais elevadas e melhor captação de luminosidade. Morais (2009) relaciona a radiação luminosa com o crescimento e desenvolvimento das plantas, afirmando que a luminosidade atua diretamente na fotossíntese, processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos. Maiores irradiações podem promover maior produção de folhas, raízes e ramificações e aumento de biomassa (GAZOLLA-NETO et al., 2013). Colares e Seeliger (2006) testando níveis de irradiância em *Ruppia marítima* L., observam diferença sobre o crescimento das folhas, maior produção de folhas, raízes e ramificações. Beltrão, Fideles Filho e Figueirêdo (2002) afirmam que o cultivo em ambiente protegido controla condições edafoclimáticas, como temperatura, umidade de ar, radiação luminosa, vento e composição atmosférica. A evapotranspiração também é influenciada dentro da casa de vegetação, o que viabiliza uma produção em épocas do ano pouco favoráveis, pois esse componente do ciclo hidrológico atuará nas raízes e folhas das plantas (TEIXEIRA; BELTRÃO; EVANGELISTA, 2011).

O *H. perforatum* ao ser cultivado no verão (fevereiro) e sendo, posteriormente, mantido até o outono, mostra crescimento normal; porém, com baixo número de ramificações, o que inviabiliza seu cultivo comercial para obtenção de biomassa. Mesmo em cultivo protegido, o declínio de temperaturas no outono prejudica a produção da espécie. O comprimento e a massa fresca da raiz não diferiram entre os tratamentos. No entanto, a média geral do Exp.-Primavera/verão foi superior ao Exp.-Verão/outono em ambos os casos, principalmente em relação a massa fresca da raiz (Tabela 6).

Tabela 6 – Comprimento médio (cm) e massa fresca da raiz (g) (\pm Erro padrão) de plantas de *Hypericum perforatum* submetidas ao tratamento com altas diluições dinamizadas, Lages/SC, 2018.

| Tratamento | Comprimento da raiz (cm) | Massa fresca da raiz (g) |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Exp.-Primavera/verão | |
| <i>Kali carbonicum</i> | 25,90 \pm 1,66 ^{ns} | 40,59 \pm 7,77 ^{ns} |
| <i>Natrum muriaticum</i> | 26,94 \pm 2,22 | 52,12 \pm 8,57 |
| <i>Phosphorus</i> | 22,70 \pm 0,89 | 54,54 \pm 10,86 |
| <i>Silicea terra</i> | 23,32 \pm 1,21 | 42,02 \pm 3,05 |
| Controle | 25,40 \pm 1,45 | 41,57 \pm 3,02 |
| Média e erro | 24,93 \pm 0,71 | 46,16 \pm 3,22 |
| | Exp.-Verão/outono | |
| <i>Kali carbonicum</i> | 19,78 \pm 1,46 ^{ns} | 7,32 \pm 0,94 ^{ns} |
| <i>Natrum muriaticum</i> | 19,22 \pm 1,93 | 7,62 \pm 0,84 |
| <i>Phosphorus</i> | 20,46 \pm 1,59 | 4,91 \pm 0,86 |
| <i>Silicea terra</i> | 22,75 \pm 2,22 | 5,20 \pm 0,77 |
| Controle | 20,43 \pm 1,19 | 6,22 \pm 0,76 |
| Média e erro | 20,52 \pm 0,76 | 6,24 \pm 0,41 |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si (5% de significância). ns= não significativo.

Percebe-se que a época de cultivo de *H. perforatum* influenciou sobre todas as variáveis analisadas, mas não discriminou os tratamentos. Em relação a influência da homeopatia na agricultura, Bonato e Silva (2003) afirmam que os preparados homeopáticos se comportam como energia e quando dinamizados a frequência de onda permanece fixa, ocorrendo variação somente sobre a amplitude da mesma, podendo assim, alterar as respostas de forma negativa ou positiva. As matérias médicas homeopáticas atuam em forma de vibração, agindo sobre a amplitude da onda e conseqüentemente refletindo sobre os organismos biológicos (KOLISKO e KOLISKO, 1978; SILVA et al., 2005). Andrade e Casali (2011) afirmam que as matérias médicas reagem sobre o campo eletromagnético de forma diferente, dependendo da vitalidade da planta. Desse modo, a atuação nos organismos dependerá do preparado homeopático escolhido, a centesimal hahnemanniana utilizada ou o método de aplicação. Bonato, Proença e Reis (2009), conduzindo experimento em casa de vegetação com *Mentha arvensis* L., aplicaram *Arsenicum album* e *Sulphur* nas diluições centesimais de 6, 12, 24 e 30CH. Os mesmos autores relatam que ambos os preparados atuaram sobre a menta, modificando o metabolismo das plantas e incrementando sobre o teor de óleo essencial, no entanto, de forma diferenciada pelas diferentes dinamizações.

Costa et al. (2018) relatam que a aplicação de preparados homeopáticos em alface promoveu maior crescimento de raízes, número de folhas por planta, bem como, maior vigor

destas, quando realizado pulverização nas mesmas. Andrade (2004) afirma que a aplicação de homeopatia no solo pode atuar sobre o metabolismo microbiano, influenciando sobre os processos de mineralização e imobilização da matéria orgânica. Isto pode alterar a condutividade elétrica, a capacidade de retenção de água e a formação de agregados do solo.

As variáveis massa fresca da parte aérea, massa seca geral e por planta da parte aérea, não mostraram diferença estatística entre os tratamentos. Porém, para a quantidade de massa fresca da parte aérea percebe-se que o Exp.-Primavera/verão foi 17 vezes maior que o Exp.-Verão/outono, resultando em um incremento equivalente a 1612,92% (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios (\pm Erro padrão) da massa fresca da parte aérea e massa seca geral e por planta da parte aérea de *Hypericum perforatum*, Lages/SC, 2018.

| Tratamento | Massa fresca da parte aérea (g) | Massa seca da parte aérea (g) | Massa Seca por planta (g) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Exp.-Primavera/verão | | | |
| Kali-c | 133,75 \pm 21,03 ^{ns} | 22,90 \pm 3,26 ^{ns} | 2,51 \pm 0,47 ^{ns} |
| Nat-m | 128,29 \pm 19,91 | 22,49 \pm 3,24 | 1,99 \pm 0,22 |
| Phos | 165,87 \pm 24,73 | 28,20 \pm 4,46 | 2,96 \pm 0,27 |
| Sil | 151,67 \pm 25,83 | 29,20 \pm 5,19 | 2,62 \pm 0,47 |
| Controle | 189,61 \pm 25,65 | 35,94 \pm 4,86 | 3,34 \pm 0,35 |
| Média e erro | 153,82 \pm 10,67 | 27,74 \pm 2,04 | 2,67 \pm 0,18 |
| Exp.-Verão/outono | | | |
| Kali-c | 11,66 \pm 2,70 ^{ns} | 1,75 \pm 0,19 ^{ns} | 0,16 \pm 0,01 ^{ns} |
| Nat-m | 10,59 \pm 2,15 | 1,96 \pm 0,20 | 0,19 \pm 0,01 |
| Phos | 5,97 \pm 1,01 | 1,38 \pm 0,21 | 0,13 \pm 0,02 |
| Sil | 8,25 \pm 2,05 | 1,40 \pm 0,15 | 0,13 \pm 0,01 |
| Controle | 8,46 \pm 2,12 | 1,51 \pm 0,17 | 0,16 \pm 0,01 |
| Média e erro | 8,98 \pm 0,94 | 1,59 \pm 0,09 | 0,15 \pm 0,01 |

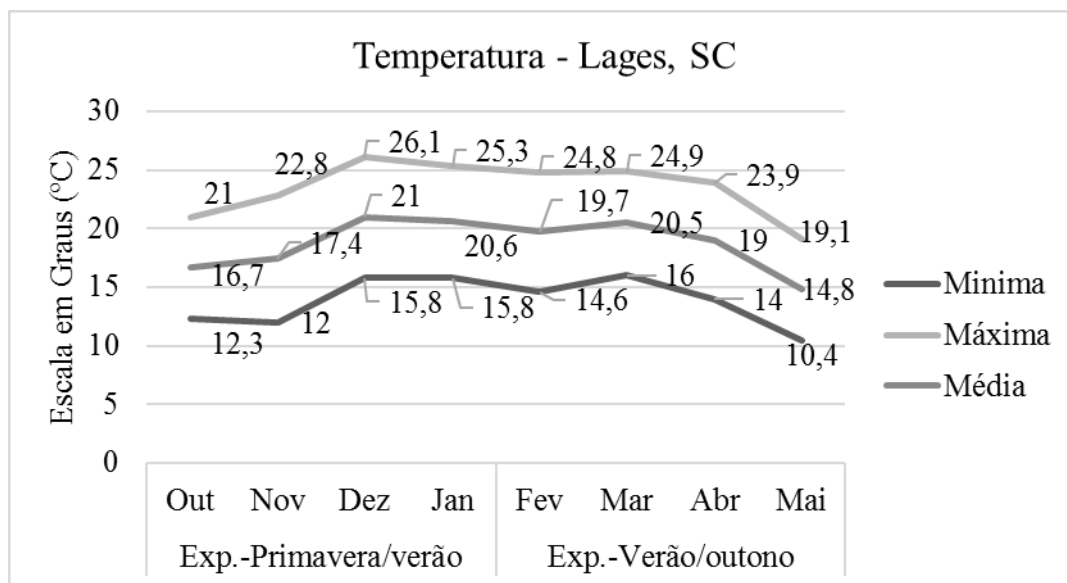
*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (5% de significância). \pm Erro padrão. Kali-c = *Kali carbonicum*; Nat-m = *Natrum muriaticum*; Phos = *Phosphorus*; Sil = *Silicea terra*. ns= não significativo.

A produção superior de biomassa no Exp.-Primavera/verão pode ser explicado pela época de cultivo da espécie, visto que com o plantio na primavera as plantas de *H. perforatum* melhoram a assimilação da irradiação solar e são estimuladas pela temperatura primaveril (aproximadamente 20 °C). Estudos tem mostrado que o ambiente de casa de vegetação interfere sobre o crescimento vegetativo em plantas medicinais. Camilo, Luz e Resende (2009), avaliando o crescimento de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em casa de vegetação e campo, relatam que independente da adubação utilizada, o cultivo em ambiente protegido apresentou melhor desempenho vegetativo. Da mesma maneira, Resende (2010), estudando a mesma

espécie, relata que em ambiente protegido houve maior desenvolvimento da cultura, produção e influenciou positivamente sobre o rendimento de óleo essencial.

Verificou-se diferença entre os experimentos na média geral para todas as variáveis, sendo que o Exp.-Primavera/verão foi superior em todos os casos. Deste modo, o cultivo realizado entre os meses de outubro de 2017 e janeiro de 2018 apresentou estabelecimento e desenvolvimento das plantas de *Hypericum perforatum* pelas melhores condições climáticas predominantes durante este período. Os dados fornecidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM) mostra que temperaturas mais altas foram registradas no mês de dezembro e janeiro, enquanto conduzia-se o Exp.-Primavera/verão. Com o declínio da temperatura, a partir do mês de março (Figura 10), o desenvolvimento das plantas no Exp.-Verão/outono não atingiu altura e ramificações adequadas para o estabelecimento da planta.

Figura 11 – Variação da temperatura (°C) predominante no município de Lages/SC, entre os meses de outubro de 2017 e maio de 2018. Lages/SC, 2018.



Fonte: Adaptado de CIRAM/EPAGRI, 2018.

De acordo com os dados de temperatura mínima e máxima entre os meses outubro/2017 e maio/2018 para a região de Lages, é possível inferir que a melhor época de cultivo para as plantas de *Hypericum perforatum* é entre os meses de outubro a janeiro. Isto porque o crescimento da espécie em condições controladas iniciadas na primavera proporcionou maior número de ramificações, comprimento superior e rendimento de biomassa em relação ao cultivo realizado no verão.

Por se tratar de uma espécie perene nativa da Europa, os estudos acerca do *H. perforatum* não possuem data específica para plantio e colheita, sendo em sua maioria pesquisas apenas de identificação e coleta em campos nativos. Bütter et al. (1998) demonstram, em experimento realizado na Suíça, durante dois anos consecutivos em plantio em casa de vegetação, que o período de fevereiro a maio, final do inverno e primavera no hemisfério norte seria o ideal. Após o período de crescimento inicial e aclimatação, as mudas podem ser conduzidas a campo. Apesar disso, esses autores relatam haver queda no número de ramificações e crescimento vegetativo no primeiro ano de estabelecimento das mudas, indicando que a espécie necessita de maiores períodos para atingir alta produtividade foliar.

3.5 CONCLUSÃO

O crescimento semanal do *Hypericum perforatum* no Exp.-Primavera/verão não foi acelerado pela utilização das altas diluições dinamizadas testadas. No Exp.-Verão/outono *Natrum muriaticum* 12CH mostrou-se superior (30,17 cm) em relação ao controle (26,22 cm), mas não diferindo de *Kali carbonicum* (28,91 cm) e *Phosphorus* (28,04 cm).

As variáveis altura do maior ramo, número de ramificações e rendimento de biomassa não foram influenciados com a utilização das altas diluições dinamizadas. Entretanto, a época de cultivo primavera/verão promoveu maiores índices nas variáveis analisadas em relação à época verão/outono.

O cultivo de *Hypericum perforatum* na primavera resulta em maior número de ramificações (24,62 cm), altura de plantas (42,32 cm) e rendimento de biomassa (2,67 g).

4 CAPÍTULO 3 - INCREMENTO DE GLÂNDULAS ESCURAS E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE *HYPERICUM PERFORATUM* L. SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM ALTAS DILUIÇÕES DINAMIZADAS

4.1 RESUMO

Hypericum perforatum apresenta compostos biologicamente ativos que atuam sobre diversas funções do organismo humano com potencial de restabelecer a saúde quando enfermo. A capacidade de agir como antiviral, antimicrobiano, antitumoral e antidepressivo, tornou a espécie de alta importância farmacêutica e popular. O composto majoritário de *H. perforatum* é a hipericina armazenada em glândulas escuras nas folhas e flores. Pesquisas tem procurado avançar sobre tratamentos não residuais em espécies medicinais para otimização de metabólitos secundários, priorizando o composto majoritário. Neste sentido, tratamentos com altas diluições mostram-se como recurso terapêutico capaz de atuar sobre o metabolismo da planta e, conseqüentemente sobre a quantidade de compostos, sem alterar a qualidade destes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos preparados em altas diluições dinamizadas sobre o incremento de glândulas escuras e produção de fenólicos em plantas de *Hypericum perforatum*. Plantas foram cultivadas em duas épocas, na casa de vegetação da Estação Experimental da EPAGRI, Lages/SC. O delineamento experimental foi o completamente casualizado com 5 tratamentos, 12 repetições com 4 plantas por vaso. Aplicações de preparados homeopáticos foram realizadas, semanalmente, durante dois meses. As plantas de *H. perforatum* foram tratadas com *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra* na 12CH e água destilada como controle. A colheita para avaliação do Exp.-Primavera/verão foi realizada no mês de fevereiro/2018 e do Exp.-Verão/outono em junho/2018. Foram retiradas aleatoriamente cinco folhas de cada planta, totalizando 240 folhas por tratamento. Após a colheita, realizou-se contagem de glândulas escuras utilizando microscópio estereoscópico. O restante das folhas foi seco em estufa durante 48 horas a 50 °C. Após a secagem do material, realizou-se preparação do extrato hidroalcoólico das folhas. Selecionou-se o preparado homeopático que apresentou melhores resultados quanto a contagem de glândulas escuras. Deste modo, utilizou-se as plantas tratadas anteriormente com *Silicea terra* 12CH e o controle com água destilada. Utilizou-se rotaevaporador rotatório para obtenção de extrato hidroalcoólico bruto e posteriormente fracionamento do extrato para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Todos os dados foram analisados com o auxílio do ambiente R, considerando o nível de 5% de significância. Para contagem de glândulas escuras não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas sim entre as épocas de cultivo. Na cromatografia foram avaliados 18 compostos. Há alteração na quantidade de compostos somente em relação a época de plantio e colheita, não havendo alteração com a utilização de *Silicea terra*. Deste modo, são necessários maiores estudos com outros preparados homeopáticos, bem como, graus de dinamização para estimular a produção de compostos bioativos em plantas de *H. perforatum*.

4.2 INTRODUÇÃO

A espécie *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como erva-de-São-João, têm sido utilizada como planta medicinal para o tratamento de diferentes doenças, mas de modo especial na depressão leve a moderada (CHIOVATTO et al., 2011). A atividade biológica de *H. perforatum* é atribuída a mais de dez classes de compostos entre os quais, antraquinonas/naftodiantronas, derivados de floroglucinol, flavonoides, biflavonas, xantonas, aminoácidos, óleos voláteis, vitamina C, taninos, carotenoides e cumarinas (HUSSAIN; ANSARI; ARIF, 2009). A hipericina e a pseudo-hipericina são os componentes mais estudados e derivam do núcleo antraquinona/naftodiantrona, os quais contribuem no efeito antidepressivo (BRISKIN, 2000).

Relatos têm demonstrado a capacidade da hipericina agir como antiviral (KUBIN et al., 2005), antimicrobiana (SADDIQE; NAEEM; MAIMOONA, 2010) e antitumoral (MISKOVSKY, 2002). Conforme Karioti e Bibia (2010), a hipericina é considerada o mais poderoso fotossensibilizante natural já descrito. Estudos pré-clínicos mostram que a ação dos compostos biologicamente ativos do *H. perforatum* exibem capacidade ansiolítica e nootrópica (BEN-ELIEZER; YECHIAM, 2016); antihiperiglicêmica (AROKIYARAJ; BALAMURUGAN; AUGUSTIAN, 2011); antirreumática, para tratamento de excitação nervosa e distúrbio do sono (VAN WYK; OUDTSHOORN; GERICKE, 2002). Outras pesquisas relatam ainda o benefício do uso para tratamento de alcoolismo, tabagismo e dependência de cafeína (CAN et al., 2011). Sosa et al. (2007) reportam a utilização da planta como anti-inflamatória. Testes realizados para a atividade antibacteriana foram bastante promissores, mostrando resultados positivos quanto ao potencial na atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-positivas, como o *Streptococcus pyogenes* e *Corynebacterium diphtheriae* (SCHEMPP et al., 1999).

A hipericina acumula-se em estruturas morfológicas especializadas conhecidas como glândulas escuras, ocorrendo nas folhas desde as primeiras fases do crescimento da planta. Durante o período de floração, as glândulas escuras expandem-se a quase todas as partes da flor (FORNASIERO; BIANCHI; PINETTI, 1998; KOSUTH et al., 2003). As concentrações de hipericina e pseudo-hipericina dependerão de diferentes fatores, tais como, a época de plantio e colheita, fases fenológicas coletadas e utilização de tratamentos adequados (SOUTHWELL; BOURKE, 2001; CIRAK et al., 2007; GERM et al., 2010).

Conhecendo o potencial fitoterápico das plantas de *H. perforatum*, estudos acerca do incremento de glândulas escuras e produção de compostos fenólicos são desejáveis a fim de potencializar os efeitos já comprovados. O uso de preparados em altas diluições dinamizadas em plantas medicinais tem demonstrado efeito positivo no incremento de metabólitos secundários (CAPRA et al., 2014). Andrade et al. (2012), aplicando altas diluições dinamizadas para crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.), demonstram alterações na produção de cumarina quando utilizado o preparado na 30CH (trigésima centesimal hahnemanniana). Estudo realizado por Fonseca, Casali e Cecon (2006), no incremento de tanino nas folhas e raízes de *Porophyllum ruderale*, descrevem que houve aumento para diferentes preparados homeopáticos utilizados.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos preparados em altas diluições dinamizadas sobre o incremento de glândulas escuras, conseqüentemente da hipericina, bem como, na produção de compostos fenólicos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Semeadura e cultivo

Sementes de *Hypericum perforatum* foram semeadas em bandejas e mantidas em sala climatizada (25 °C com fotoperíodo de 16/8h) no Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal, posteriormente, transplantadas para casa de vegetação na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental (EPAGRI) de Lages.

O experimento em sala climatizada foi realizado em delineamento casualizado em blocos, com parcela experimental composta por 12 plantas em sementeira com 5 tratamentos e 4 repetições. Utilizou-se substrato de vermiculita e terra preta na proporção de 2:1. Após a emergência das sementes (15 dias), iniciou-se aplicação semanal de preparados homeopáticos. Os tratamentos utilizados foram *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Silicea terra*, todos na 12CH, e água destilada como controle. Após seis semanas em sala climatizada foi realizado transplante das plantas para vasos em casa de vegetação. Foram utilizados vasos de 8,7 litros compostos de vermiculita, solo preto e esterco de ovelha na proporção de 1:1:1. O delineamento foi completamente casualizado, com 4 plantas por vaso. As aplicações de preparados homeopáticos continuaram semanalmente, dispensados no solo. As plantas

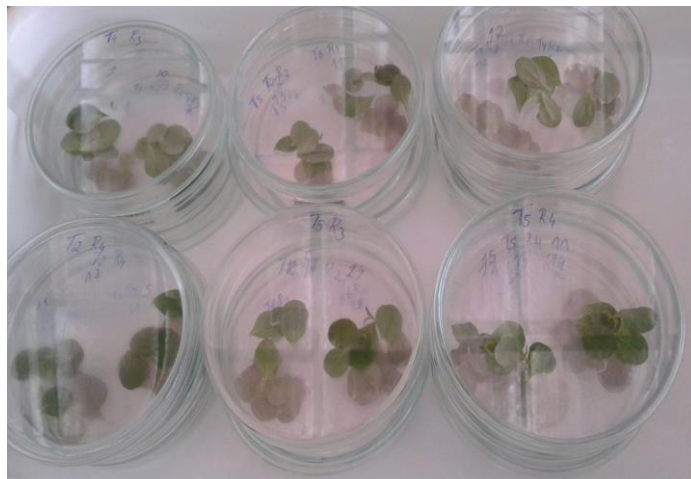
continuaram na casa de vegetação por mais 30 dias, até serem realizadas mais quatro aplicações (Capítulo 2, p. 46-47).

Como foram realizados dois experimentos, separadamente, sendo Exp.-Primavera/verão e Exp.-Verão/outono, a coleta de material do Exp.-Primavera/verão foi realizada no mês de fevereiro/2018, enquanto que a do Exp.-Verão/outono realizou-se no mês de junho de 2018. A contagem das glândulas escuras foi realizada em amostra destrutiva de cinco folhas de cada planta, sendo realizada 18 dias após a última aplicação dos preparados homeopáticos. O restante do material (folhas e raízes) foi disposto em estufa de circulação forçada de ar para secagem durante 48 horas, a temperatura constante de 50 °C.

4.3.2 Avaliação das glândulas escuras

Glândulas escuras foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópico (25x), no Laboratório de Homeopatia e Saúde Vegetal da Estação Experimental (EPAGRI) de Lages. Cinco folhas por planta, de cada parcela experimental, foram amostradas, totalizando 240 folhas por tratamento (Figura 12).

Figura 12 – Folhas de *Hypericum perforatum* utilizadas para contagem de glândulas escuras.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.3.3 Preparação dos extratos hidroalcoólicos

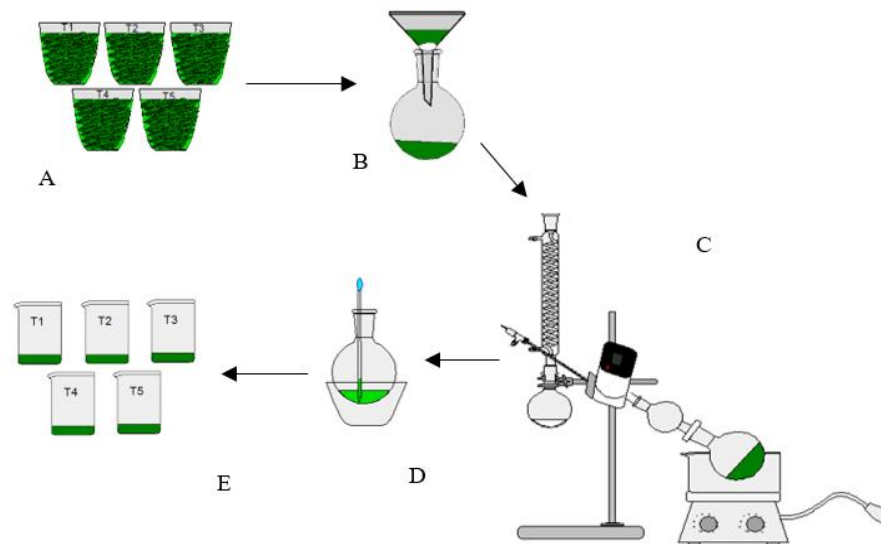
A extração de compostos das folhas de *H. perforatum* foi realizada em apenas dois tratamentos, (a) o controle, tratamento que utilizou somente água destilada e (b) tratamento com preparado homeopático *Silicea terra* 12CH, que apresentou melhores resultados quanto ao

número de glândulas escuras. A preparação dos extratos foi realizada nos meses de março a novembro de 2018, junto ao Laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus de Curitibanos.

Os extratos foram obtidos por meio de maceração exaustiva utilizando álcool etílico comercial 92 INPM (Figura 13). Inicialmente, as folhas de *Hypericum perforatum* foram trituradas e condicionadas em embalagens de vidro, de acordo com o respectivo tratamento e repetição. Para realização da trituração dos tratamentos utilizou-se 48 plantas, divididas em 4 repetições. A cada frasco foi adicionado álcool etílico 92 INPM até o recobrimento de todas as folhas. O material foi mantido sob maceração à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante sete dias. Após filtração, o solvente foi removido por evaporação em evaporador rotatório, à uma temperatura de 45 °C, para a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto (EHB).

As folhas que restaram, após filtração, permaneceram no frasco de vidro, as quais foram imersas novamente em álcool etílico comercial 92 INPM. O procedimento de extração e evaporação do solvente foi repetido por mais duas vezes com cada um dos tratamentos e repetições até a diminuição considerável da massa extraída no processo de maceração. Os extratos obtidos para cada uma das macerações foram combinados para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos brutos: 4 EHB (4 repetições) para o tratamento controle e 4 EHB (4 repetições) para o tratamento com o preparado homeopático *Silicea terra*.

Figura 13 – Sequência do processo de maceração exhaustiva: (A) Folhas de *Hypericum perforatum* submersas em álcool 92 INPM; (B) Filtragem do resíduo após 7 dias; (C) Utilização de Rotaevaporador para a concentração dos extratos; (D) Uso de pipeta de vidro para retirada do material no balão volumétrico; (E) Extratos prontos para análise após remoção da água residual em liofilizador.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O material da extração foi coletado com auxílio de pipeta de vidro e disposto em vidrarias identificadas por tratamento e repetição. Todo o processo descrito foi repetido três vezes, para garantir extração total dos componentes. Para remoção da água residual, os extratos ainda foram congelados e liofilizados por 12h obtendo-se 4 extratos brutos por tratamento.

4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As frações dos extratos de *Hypericum perforatum* permaneceram refrigeradas até o momento da análise. Para avaliação do perfil de compostos fenólicos em HPLC, as amostras foram preparadas removendo os componentes apolares através de extração sólido-líquido usando hexano como solvente extrator. Cerca de 0,5 g de EHB foi submetido à extração com 2 mL de Hexano, repetindo-se o procedimento 3 vezes. Após remoção do solvente com auxílio de pipeta de Pasteur, repetiu-se o processo por mais duas vezes para obtenção dos extratos livres de substâncias apolares. Desse modo, foram preparadas 100 mL de solução estoque à 1000 ppm dissolvendo 100 mg do material insolúvel em hexano em solução 5% de acetonitrila em água.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI) no Centro de Ciências Rurais na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos. Para as separações cromatográficas utilizou-se instrumento Agilent Infinity 1260 equipado com bomba quaternária, compartimento de coluna termostaticado, amostrador automático e detectores de fluorescência (FLD) e UV-Vis (DAD). Para a separação cromatográfica, as amostras foram filtradas (0,22 µm) e 20 µL foram injetados em coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 X 150mm X 3,5µm) da Agilent precedida por uma pré-coluna Eclipse Plus C18 (4,6 X 12,5mm X 5µm). A separação cromatográfica foi adaptada de metodologia previamente publicada por Milevskaya et al. (2016), a qual foi realizada com gradiente de solvente utilizando 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em água (solvente B) de acordo com o seguinte programa: 0-10 min de 100% B; 10-20 min de 20% A e 80% B; 20-21 min 80% A e 20% B; 21-25 min de 100% A; 25-30 min de 80% A e 20% B; 30 min, 100% B. Foi utilizado fluxo da fase móvel de 0,6 mL/min, temperatura do compartimento da coluna de 40 °C e injeção de 20 µl por amostra na concentração de 1000 ppm. Os dados foram coletados utilizando detector de arranjo de diodos (DAD) nos comprimentos de onda 220, 254, 272, 320 e 590 nm.

Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Os dados foram coletados e analisados em software OpenLab CDS Chemstation e o perfil de compostos fenólicos foi avaliado em 320 nm e expressos na forma de porcentagem relativa.

4.3.5 Análise estatística

Os dados obtidos sobre o número de glândulas escuras nas folhas do *Hypericum perforatum* foram submetidos a análise de variância (teste F), sendo verificadas as pressuposições de homocedasticidade (teste de Bartlett) e normalidade (teste Shapiro-Wilk).

Nos dados obtidos através dos comprimentos de onda da HPLC, determinou-se padronizar os compostos no comprimento de onda de 320 nm. Para os compostos registrados através do cromatograma, realizou-se média sobre a porcentagem da área por tratamento, repetição e época de cultivo. Os dados foram analisados por teste F, comparando os tratamentos e experimentos realizados. Para o tempo de retenção dos compostos realizou-se média para padronizar as amostras na cromatografia.

Todas as análises estatísticas foram processadas com o auxílio do ambiente R (R Core Team, 2017) considerando o nível de 5% de significância.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de glândulas escuras presentes nas folhas de plantas de *H. perforatum* não diferiu entre os diferentes preparados homeopáticos e nem da testemunha. Entretanto, o Exp.-Primavera/verão apresentou maior número de glândulas escuras que o Exp.-Verão/outono (Tabela 8).

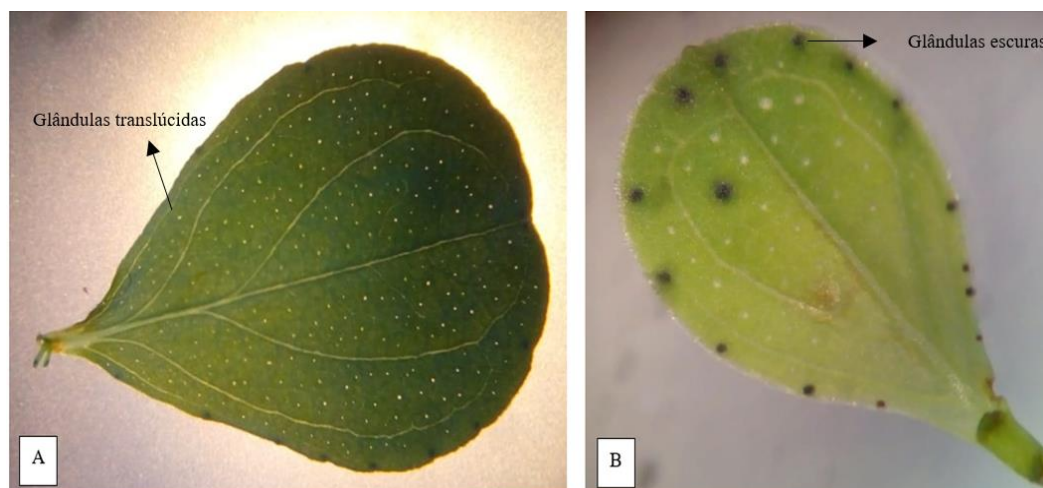
Tabela 8 - Número médio (\pm Erro padrão) de glândulas escuras presentes na face abaxial das folhas de plantas de *Hypericum perforatum* tratadas com diferentes altas diluições dinamizadas.

| Tratamento | Glândulas escuras (n°) | |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Exp.-Primavera/verão | Exp.-Verão/outono |
| <i>Kali carbonicum</i> 12CH | 14,76 \pm 0,44 ^{ns} | 12,75 \pm 0,54 ^{ns} |
| <i>Natrum muriaticum</i> 12CH | 15,39 \pm 0,41 | 13,37 \pm 0,37 |
| <i>Phosphorus</i> 12CH | 14,64 \pm 0,65 | 12,20 \pm 0,43 |
| <i>Silicea terra</i> 12CH | 16,41 \pm 0,56 | 13,28 \pm 0,34 |
| Controle | 16,24 \pm 0,51 | 12,54 \pm 0,38 |
| Média e erro | 15,51 \pm 0,24 | 12,83 \pm 0,19 |

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si (5% de significância). ns= não significativo.

O número de glândulas escuras pode variar de acordo com o estágio de crescimento da planta de *H. perforatum*, e, conseqüentemente, afetar a produção de hipericina e pseudo-hipericina. Southwell e Bourke (2001) relatam que ambos os compostos aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão (BRANTNER; KARTNIG; QUEHENBERGER, 1994). Kladar et al. (2015), também, relatam que os estádios fenológicos, como a floração (antes, durante e após), influenciam no metabolismo secundário da planta. Em nossa pesquisa, observa-se aumento de glândulas escuras na planta cultivada na primavera/verão (15,51), expresso pelo número de glândulas por folha. Na espécie *H. perforatum*, as glândulas escuras são estruturas morfológicas especializadas responsáveis pelo armazenamento de hipericina, que ocorre nas folhas desde as primeiras fases do crescimento da planta. Durante o período de floração, as glândulas escuras expandem-se a quase todas as partes da flor (FORNASIERO; BIANCHI; PINETTI, 1998; KOSUTH et al., 2003). As substâncias armazenadas nessas glândulas fazem parte do grupo das antraquinonas/naftodiantronas (BRISKIN, 2000) (Figura 14B).

Figura 14 – Estruturas morfológicas que armazenam compostos bioativos em plantas de *Hypericum perforatum*. A) Glândulas translúcidas na face adaxial das folhas; B) Glândulas escuras na face abaxial das folhas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

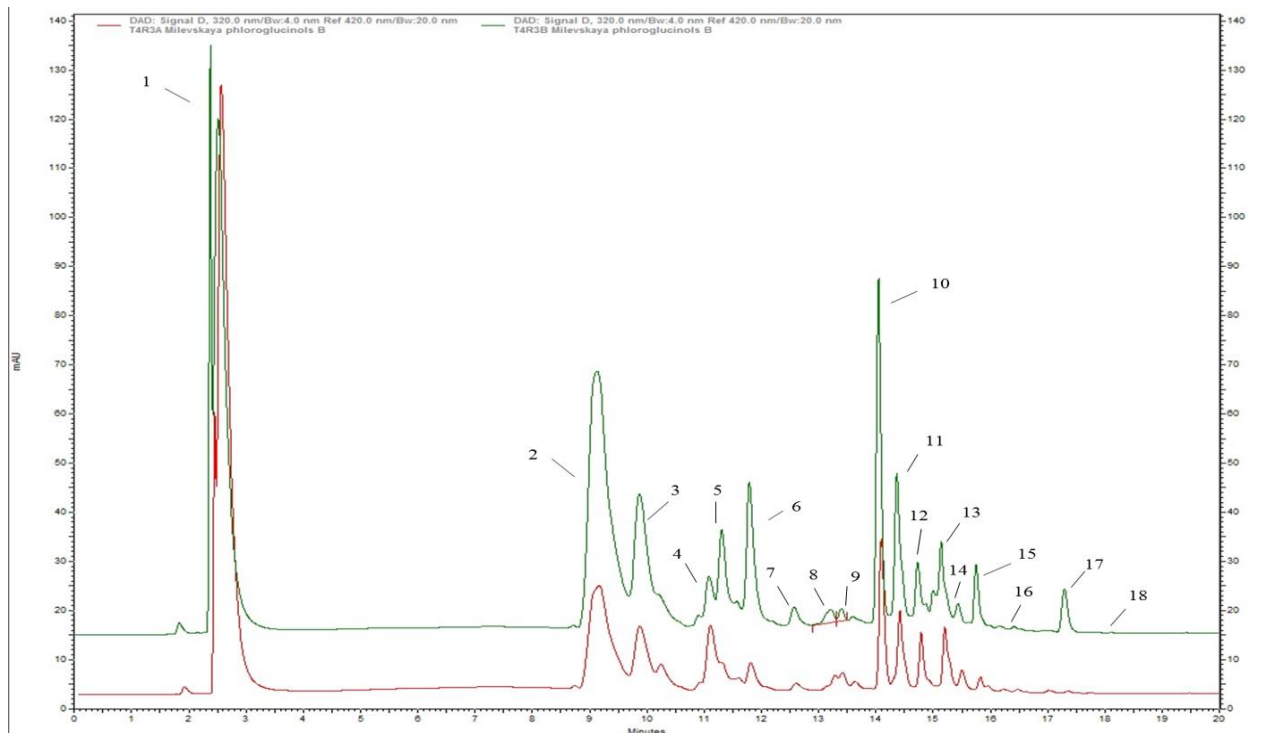
Os estudos acerca da importância do composto demonstram que a hipericina é o mais poderoso fotossensibilizante natural já descrito (MARTINEZ-POVEDA; QUESADA; MEDINA, 2005). A hipericina apresenta propriedades muito específicas, como forte absorção a comprimento de onda mais longo (590nm), uma toxicidade mínima (KARIOTI; BILIA, 2010) certa seletividade tumoral e uma taxa de depuração muito maior quando em contato com o corpo hospedeiro, isso permite que as ações fitoterápicas sobre o organismo humano durem mais tempo e tenham maior eficiência (MISKOVSKY, 2002).

As glândulas translúcidas são consideradas estruturas morfológicas responsáveis pelo acúmulo de alcaloides, lipídios, resinas e óleos essenciais, conferindo assim, maiores ações farmacológicas (CICCARELLI; ANDREUCCI; PAGNI, 2001). De acordo com Gaid et al. (2016), o constituinte principal dessas estruturas é a hiperforina. Atuando, juntamente com a hipericina, a hiperforina é capaz de agir como inibidor na recaptção da serotonina, dopamina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e L-glutamato (CHATTERJEE et al., 1998; CAPASSO et al., 2003). Schempp et al. (2002) e Hostanska et al. (2003), mostram que a hiperforina tem ação anticancerígena, inibindo as linhagens de células tumorais. As glândulas translúcidas são estruturas facilmente visualizadas quando dispostas a favor da luz, pois apresentam aparência de pequenos “orifícios” na face adaxial das folhas (Figura 14A).

A eficiência terapêutica da espécie poderá depender da quantidade e concentrações dos compostos biologicamente ativos. Para tal, Bozin et al. (2013) afirmam que os compostos majoritários têm sido avaliados, pois a partir destes é possível distinguir a influência de

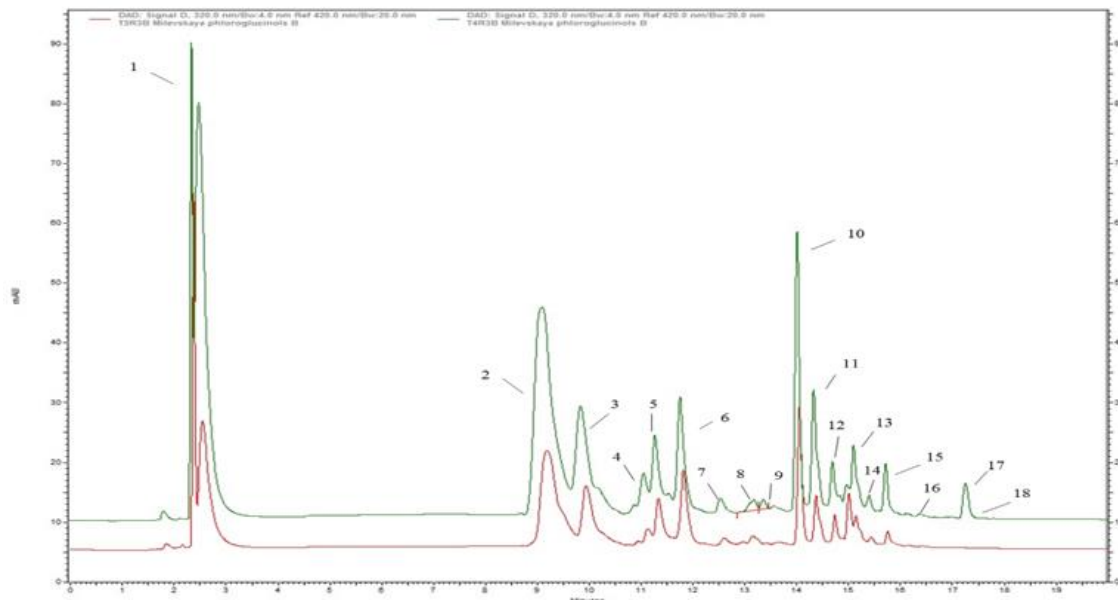
diferentes regiões geográficas e épocas de cultivo, visto que estes fatores também podem influenciar na quantidade e qualidade de compostos. Portanto, é de extrema importância realizar a análise dos compostos considerando diferentes tratamentos, épocas de plantio e colheita. Em nosso estudo, a partir da cromatografia gerada no comprimento de onda 320 nm foi possível registrar 18 componentes diferentes presentes no extrato alcoólico de *H. perforatum*, identificados em duas diferentes épocas de plantio e nos tratamentos com água destilada e com o preparado homeopático *Silicea terra*. Não foi possível quantificar e identificar a hipericina, visto que é necessário a utilização do padrão do referido composto (Figura 15 e Figura 16).

Figura 15 – Cromatografia dos compostos de extrato alcoólico de *Hypericum perforatum* no comprimento de onda 320 nm no Exp.-Primavera/verão (T4R3A) e Exp.-Verão/outono (T4R3B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 16 – Cromatografia dos compostos de extrato alcoólico de *Hypericum perforatum* no comprimento de onda 320 nm para o controle (T4R3B) e para *Silicea terra* (T5R3B).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os compostos majoritários presentes na cromatografia não foram possíveis de identificar. Porém, relata-se o tempo de retenção encontrado no comprimento de onda utilizado e a porcentagem da área no Exp.-Primavera/verão e Exp.-Verão/outono para os tratamentos testados. Entre os tratamentos *Silicea terra* e controle não houve diferença estatística, mas entre as épocas de cultivo sim. Os compostos 1 e 4 apresentaram maior porcentagem de área no Exp.-Primavera/verão quando comparado ao Exp.-Verão/outono. Para os compostos 2, 7, 8, 10, 11 e 15 a porcentagem de área foi superior no Exp.-Verão/outono. Para os demais compostos não houve diferença estatística (Tabela 9).

Tabela 9 - Compostos biologicamente ativos obtidos através de extrato hidroalcoólico de *Hypericum perforatum*, tempo de retenção no comprimento de onda 320 nm e porcentagem da área.

| Composto | Tempo de retenção (min) | Porcentagem da área | | | Porcentagem da área | | |
|----------|-------------------------|----------------------|--------------|----------------|----------------------|--------------|----------------|
| | | Exp.-Primavera/verão | | | Exp.-Verão/outono | | |
| | | <i>Silicea terra</i> | Controle | Geral | <i>Silicea terra</i> | Controle | Geral |
| 1 | 2,484 | 57,14 ± 2,39 | 52,49 ± 2,84 | 54,82 ± 1,93 a | 36,76 ± 1,51 | 35,69 ± 3,19 | 36,23 ± 1,64 b |
| 2 | 9,047 | 14,00 ± 0,46 | 15,79 ± 1,31 | 14,89 ± 0,72 b | 20,01 ± 1,28 | 17,93 ± 1,48 | 18,97 ± 0,99 a |
| 3 | 9,775 | 5,28 ± 1,66 | 5,25 ± 0,57 | 5,27 ± 0,82 a | 6,18 ± 1,64 | 6,49 ± 0,37 | 6,33 ± 0,78 a |
| 4 | 10,136 | 0,66 ± 0,14 | 0,67 ± 0,10 | 0,66 ± 0,08 a | 0,10 ± 0,05 | 0,08 ± 0,03 | 0,09 ± 0,03 b |
| 5 | 10,925 | 1,18 ± 0,24 | 1,33 ± 0,09 | 1,26 ± 0,12 a | 1,57 ± 0,44 | 1,58 ± 0,55 | 1,57 ± 0,32 a |
| 6 | 11,155 | 0,76 ± 0,34 | 1,73 ± 0,87 | 1,24 ± 0,47 a | 2,02 ± 0,34 | 1,77 ± 0,48 | 1,90 ± 0,30 a |
| 7 | 11,454 | 0,14 ± 0,05 | 0,11 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02 b | 0,26 ± 0,10 | 0,34 ± 0,07 | 0,30 ± 0,06 a |
| 8 | 11,855 | 1,57 ± 0,39 | 1,68 ± 0,32 | 1,62 ± 0,24 b | 4,47 ± 1,58 | 4,21 ± 1,14 | 4,34 ± 0,90 a |
| 9 | 13,696 | 0,12 ± 0,05 | 0,08 ± 0,04 | 0,10 ± 0,03 a | 1,51 ± 1,48 | 0,00 ± 0,00 | 0,75 ± 0,74 a |
| 10 | 13,997 | 5,23 ± 1,33 | 6,97 ± 0,54 | 6,10 ± 0,74 b | 8,90 ± 0,89 | 10,66 ± 0,41 | 9,78 ± 0,56 a |
| 11 | 14,314 | 4,48 ± 1,11 | 4,25 ± 0,52 | 4,37 ± 0,57 b | 6,79 ± 1,40 | 8,46 ± 0,63 | 7,62 ± 0,78 a |
| 12 | 14,691 | 2,23 ± 0,76 | 1,79 ± 0,11 | 2,00 ± 0,36 a | 1,73 ± 0,06 | 1,32 ± 0,15 | 1,52 ± 0,11 a |
| 13 | 14,870 | 0,69 ± 0,55 | 0,08 ± 0,02 | 0,38 ± 0,28 a | 0,29 ± 0,12 | 0,19 ± 0,02 | 0,24 ± 0,06 a |
| 14 | 15,125 | 2,15 ± 0,78 | 3,38 ± 0,30 | 2,76 ± 0,45 a | 3,66 ± 1,22 | 3,98 ± 0,31 | 3,82 ± 0,59 a |
| 15 | 15,408 | 1,25 ± 0,73 | 0,71 ± 0,06 | 0,98 ± 0,35 a | 0,41 ± 0,04 | 0,39 ± 0,02 | 0,40 ± 0,02 a |
| 16 | 15,753 | 0,60 ± 0,11 | 0,78 ± 0,13 | 0,69 ± 0,09 b | 1,72 ± 0,11 | 1,78 ± 0,17 | 1,75 ± 0,13 a |
| 17 | 17,117 | 2,12 ± 1,27 | 1,77 ± 0,85 | 1,95 ± 0,71 a | 3,32 ± 1,14 | 4,86 ± 0,74 | 4,09 ± 0,69 a |
| 18 | 17,425 | 0,01 ± 0,01 | 0,67 ± 0,32 | 0,34 ± 0,19 a | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 a |

* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente entre si. Teste F (5% de significância). ± Erro padrão.

No estudo percebe-se grande variação sobre os compostos, principalmente no composto 1, onde no Exp.-Primavera/verão corresponde a 54,82% do total dos compostos, enquanto no Exp.-Verão/outono é somente 36,23. O composto 18, mesmo que em quantidade bastante pequena (0,34%) é registrada na cromatografia do Exp.-Primavera/verão, que em comparação ao Exp.-Verão/outono apresenta-se em 0,00%. A análise sobre os compostos é realizada a fim de identificar os componentes majoritários, para melhor separação dos constituintes do extrato, pois desse modo, pode ser melhor aproveitado para formulação de medicamentos ou utilização do próprio extrato (LI; FITZLOFF, 2001).

Milevskaya et al. (2016), utilizando metodologia semelhante, descrevem que nos comprimidos de ondas testados no *Hypericum perforatum* com extrato hidroalcoólico encontram os seguintes compostos biologicamente ativos: ácido protocatecuico, ácidos cafeoilquínicos, epicatequina, rutina, hyperoside, isoquercitrina, quercetina, quercitrina, biapigenina, furo-hipericina, hiperforina, adiperforina, pseudo-hipericina e hipericina. Além destes metabólitos secundários, o *H. perforatum* apresenta, também, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido p-cumárico (STAMENKOVIĆ et al., 2013).

Os metabólitos secundários descritos e presentes em extratos de *H. perforatum* estão distribuídos nas dez classes de compostos já identificados como as antraquinonas/naftodiantronas, derivados de floroglucinol, flavonoides, biflavonas, xantonas, aminoácidos, óleos voláteis, vitamina C, taninos, carotenoides e cumarinas (HUSSAIN; ANSARI; ARIF, 2009). Assim, como verificado no estudo, a época de plantio e de colheita podem influenciar sobre as concentrações dos compostos fenólicos. Southwell e Bourke (2001) relatam que ambos os compostos, hipericina e pseudo-hipericina, aumentam de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão, influenciando desta forma na quantidade de extratos e óleos voláteis. Mesmo considerando as diferenças entre os níveis dos compostos da espécie sobre as épocas de plantio e colheita, Kladar et al. (2017) salientam que estes aspectos não são levados em conta nos países de origem, deste modo, perdendo a capacidade máxima dos princípios ativos. Esses autores comentam que a planta pode ser colhida de acordo com a necessidade do momento, visto que há grande variação entre os metabólitos secundários. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), não somente a época de colheita pode influenciar no teor dos compostos biologicamente ativos, mas também, os fatores climáticos, o solo, a disponibilidade de nutrientes fornecida à planta, época de plantio e tratamentos culturais utilizados.

Na nossa pesquisa, o preparado homeopático *Silicea terra* não interferiu sobre as concentrações dos compostos fenólicos. Todavia, estudos tem mostrado a capacidade dos preparados em altas diluições dinamizadas atuar sobre os metabólitos secundários de plantas

medicinais. Andrade et al. (2012), utilizando altas diluições do isoterápico de *Justicia* para crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.), demonstram alterações na produção de cumarina quando utilizado o preparado na 30CH (trigésima centesimal hahnemanniana). Para o incremento de tanino nas folhas e raízes de *Porophyllum ruderale*, Fonseca, Casali e Cecon (2006) descrevem aumento com os preparados homeopáticos *Kalium phosphoricum* e *Calcarea carbonica* na 4CH, utilizados com aplicação de dose única. Andrade (2000), ao utilizar o preparado homeopático *Sulphur* relata que há aumento de aproximadamente 75% no teor de cumarina em chambá quando comparado com a testemunha. Carvalho (2004) verificou que *Natrum muriaticum* 12CH, em plantas de Artemísia (*Tanacetum parthenium*), aumenta o teor de prolina nas folhas. Bonato, Proença e Reis (2009) afirmam que *Sulphur* e *Arsenicum album* são capazes de modificar o metabolismo da menta (*Mentha arvensis*), potencializando assim o óleo essencial da espécie.

Para Duarte (2007), a aplicação de preparados com altas diluições dinamizadas, pode causar diferentes respostas sobre o metabolismo das plantas e aumentar/diminuir os compostos bioativos, em função da dinamização aplicada. No estudo, não se verificou aumento no índice dos compostos fenólicos em comparação ao controle. Contudo, também não há diminuição dos mesmos, havendo somente efeitos sobre a época de plantio e colheita das plantas de *Hypericum perforatum*.

4.5 CONCLUSÃO

O número de glândulas escuras nas folhas das plantas de *Hypericum perforatum* não foi alterado pelos tratamentos homeopáticos de *Silicea terra*, *Natrum muriaticum*, *Phosphorus* e *Kali carbonicum*.

Folhas de plantas de *H. perforatum* cultivadas entre os meses de outubro a fevereiro apresentaram aumento do número de glândulas escuras em relação ao cultivo realizado nos meses de fevereiro a junho.

Extratos hidroalcoólico das folhas de *H. perforatum* evidenciaram a presença de 18 diferentes compostos bioativos.

A utilização do preparado homeopático *Silicea terra* não diferiu do controle em relação a porcentagem de área dos compostos, mas observou-se alteração na quantidade de compostos em relação a época de plantio e colheita.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa sugerem que os preparados homeopáticos *Silicea terra*, *Kali carbonicum*, *Natrum muriaticum* e *Phosphorus* apresentam efeitos distintos sobre as etapas de desenvolvimento e crescimento das plantas de *Hypericum perforatum*.

Na quebra de dormência de *H. perforatum*, verificou-se que a temperatura de 25 °C foi a melhor. A aplicação do preparado homeopático *Kali carbonicum* proporcionou aumento sobre a taxa germinativa de 62,75% para 70,75%, com menores perdas de semente e, conseqüentemente, aumentando do número de mudas viáveis. As centesimais hahnemannianas 6CH, 12CH, 20CH e 30CH de *Kali carbonicum* mostraram tendência de efeito ondulatório sobre a germinação das sementes da espécie, percebendo-se assim que a escolha do grau de diluição centesimal é tão importante como a escolha do preparado homeopático.

Por ter dormência endógena e exógena, a semente de *H. perforatum* necessita de condições adequadas para produção de mudas. Dessa maneira, é necessário incluir técnicas adequadas para seu cultivo. No presente estudo, as sementes foram cultivadas, inicialmente, em sala climatizada, mantendo-se 25 °C com fotoperíodo de 16/8 horas e quando atingiram tamanhos apropriados (aproximadamente 15 cm) foram transplantados em vasos e levados a casa de vegetação. As condições climáticas desse ambiente proporcionaram às mudas de *H. perforatum* temperaturas estáveis mais elevadas e melhor captação de luminosidade para um crescimento vegetativo mais rápido e homogêneo. Entretanto, é necessário realizar plantio e colheita no período mais adequado (primavera/verão), visto que isso influenciará sobre o crescimento e rendimento final de material.

As variáveis analisadas na pesquisa de número de ramificações, altura e rendimento de biomassa foram maiores quando iniciando o cultivo de *H. perforatum* na primavera, pois o período do verão favorece temperaturas adequadas e assim, maior crescimento das plantas. Os preparados homeopáticos utilizados atuaram de acordo com a época de cultivo, sendo que o plantio na primavera usando *Silicea terra* possibilita aumento sobre o crescimento vegetativo semanal, enquanto que o plantio durante o verão com uso de *Natrum muriaticum* proporciona melhor crescimento em relação a testemunha.

A contagem das glândulas escuras nas folhas do *H. perforatum* e análise dos compostos em HPLC permitiu estimar o efeito dos preparados homeopáticos na performance dos compostos fenólicos da planta. Os resultados encontrados evidenciam que não há incremento de glândulas escuras com a utilização do preparado homeopático *Silicea terra*, *Natrum*

muriaticum, *Phosphorus* e *Kali carbonicum* na potência de 12CH. Contudo, a escolha da época de plantio e colheita mostrou-se extremamente importante para aumento no número de glândulas escuras na espécie. No experimento onde determinou-se realizar coleta de material durante o verão (fevereiro) houve otimização sobre a variável. Para a cromatografia realizada em HPLC verificou-se a presença de 18 compostos diferentes, sendo que o preparado homeopático *Silicea terra* não diferiu do controle em relação a porcentagem de área para tais compostos. A época de cultivo interferiu sobre a porcentagem de área de alguns compostos; porém, houve incremento de ambos os experimentos realizados, somente em compostos diferentes.

A homeopatia tem se mostrado como instrumento eficiente no manejo de plantas medicinais. No entanto, são necessários maiores estudos acerca dos efeitos dos preparados homeopáticos. Com maiores pesquisas é possível aperfeiçoar a repertorização para escolha da matéria médica, a dinamização a ser utilizada, bem como, frequência, forma e dosagem das aplicações em plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 593-606, 2014.
- AMARO, H. T. R. et al. Superação de dormência em sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum* L). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 218-223, 2012.
- ANDERSON, J. E.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive components of *Allamanda schottii*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 307-8, 1988.
- ANDRADE, F. M. C. **Homeopatia no crescimento e na produção de cumarina em chambá – *Justicia pectoralis* Jacq.** 2000. 214 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- ANDRADE, F. M. C. **Alterações da vitalidade do solo com o uso de preparações homeopáticas.** 2004. 362 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- ANDRADE, F. M. C. A.; CASALI, V. W. D. C. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 1, p. 49-56, 2011.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R. C. Crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) tratadas com isoterápico. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 154-158, 2012.
- ARNCKEN, T. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) als lebendige Imagination der Depression. **Elemente der Naturwissenschaft**, n. 73, p. 43-74, 2000.
- AROKIYARAJ, S.; BALAMURUGAN, R.; AUGUSTIAN, P. Antihyperglycemic effect of *Hypericum perforatum* ethyl acetate extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 5, p. 386-390, 2011.
- BARBOSA, I. S. et al. Evaluation of the effects of homeopathic medicines on the germination seeds of *Brassica oleracea* l. var. Italica. **International Journal of High Dilution Research**, v. 11, n. 40, p. 213-214, 2012.

BELTRÃO, N. E. M.; FIDELES FILHO, J.; FIGUEIRÊDO, I. C. M. Uso adequado de casa-de-vegetação e de telados na experimentação agrícola. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 547-552, 2002.

BEN-ELIEZER, D.; YECHIAM, E. *Hypericum perforatum* as a cognitive enhancer in rodents: A meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35700, p. 1-8, 2016.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.

BILIA, A. R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. St. John`s wort and depression. Efficacy, safety and tolerability-an update. **Life Sciences**, v. 70, p. 3077-3096, 2002.

BITTRICH, V. et al. **Hypericaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB133>>. Acesso em: 04. mai. 2018.

BOFF, P. (Coord.). **Agropecuária saudável: da prevenção de doenças, pragas e parasitas à terapêutica não residual**. Lages, SC: Epagri; Udesc, 2008. 80 p.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 66, p. 43–68, 1995.

BONATERRA, G. A. et al. Neurotrophic, Cytoprotective, and Anti-inflammatory Effects of St. John's Wort Extract on Differentiated Mouse Hippocampal HT-22 Neurons. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 955, p. 1-13, 2017.

BONATO, C. M. Homeopatia: fisiologia e mecanismos em plantas. In: Seminário sobre ciências básicas em homeopatia, 4, 2004, Lages. **Anais...** Lages: CAV/UDESC; EPAGRI, 2004. p. 38-54.

BONATO, C. M.; PROENÇA, G. T.; REIS, B. Homeopathic drugs *Arsenicum album* and *Sulphur* affect the growth and essential oil content in mint (*Mentha arvensis* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 101-105, 2009.

BONATO, C. M.; SILVA, E. P. Effect of the homeopathic solution *Sulphur* on the growth and productivity of radish. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 259-263, 2003.

BONFIM, F. P. G. et al. Germination and vigor of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) pelleted with homoeopathic preparations *Alumina* and *Calcarea carbonica* subjected to toxic levels of aluminium. **International Journal of High Dilution Research**, v. 9, n. 33, p. 138-146, 2010.

BOZIN, B. et al. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 11733-11750, 2013.

BRANTNER, A.; KARTNIG, T.; QUEHENBERGER, F. Vergleichende phytochemische untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum maculatum* Crantz. **Scient Pharm**, v. 62, p. 261-276, 1994.

BRASIL (A). Ministério da Saúde. **Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014**. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília, 2014.

BRASIL (B). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. **Farmacopeia homeopática brasileira**. 3. ed. São Paulo: Andrei, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398 p.

BRASIL. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 10, de 09 de março**, Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde: **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. 2016. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 10. jan. 2018.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, p. 507-514, 2000.

BUFALO, A. C. **Antidepressivo *Hypericum perforatum* L. sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos Wistar**. 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BÜTER, B. et al. Significance of Genetic and Environmental Aspects in the Field Cultivation of *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 431–437, 1998.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMILO, J. S.; LUZ, J. M. Q.; RESENDE, R. F. Produção agronômica de *Ocimum basilicum* L. em casa de vegetação e a campo nas épocas Primavera-Verão e Outono-Inverno. In: **IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica**, p. 1-10, 2009.

CAMPBELL, H. M. Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. **Weed Research**, v. 25, p. 259–266, 1985.

CAN, Ö. D. et al. Effects of treatment with St. John's wort on blood glucose levels and pain perceptions of streptozotocin-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 576–584, 2011.

CAPASSO, F. et al. **Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine**. 1ª ed. Springer Verlag: Berlin, 2003. 420 p.

CAPRA, R. S. et al. Preparados homeopáticos e ambiente de cultivo na produção e rendimento de quercetina em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 566-573, 2014.

CARLINI, E. A. et al. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 690-695, 2006.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, L. M. **Fitoterápicos: anti-inflamatórios – aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd, 2004. 480 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012.

CASALI, V. W. D.; ANDRADE, F. M. C.; DUARTE, E. C. **Acologia de altas diluições**. Viçosa: DFT/UFV, 2009. 600p.

CÉSAR, A. T. **Dinamização**. *Cultura Homeopática*, v.2, n. 5, p. 15-41, 2003.

CHATTERJEE, S. S. et al. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Science*, v. 63, p. 499–510, 1998.

CHIOVATTO, R. D. et al. Fluoxetina ou *Hypericum perforatum* no tratamento de pacientes portadores de transtorno depressivo maior leve a moderado? Uma revisão. *Arquivos Brasileiros de Ciência da Saúde*, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2011.

CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A. C.; PAGNI, A. M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany*, v. 88, n. 4, p. 637-644, 2001.

CIRAK, C. et al. Variation of Bioactive Compounds in *Hypericum perforatum* Growing in Turkey During Its Phenological Cycle. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 49, n. 5, p. 615–620, 2007.

CIRAK, C.; AYAN, A. K.; KEYSEROGLU, K. The Effects of Light and Some Presoaking Treatments on Germination Rate of St. John's Worth (*Hypericum perforatum* L.) Seeds. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 7, p. 182-186, 2004.

CIRAK, C.; KEYSEROGLU, V.; AJAN, A. K. Breaking of seed dormancy in Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. *Journal of Arid Environments*, v. 68, p. 159-164, 2007.

COLARES, I. G.; SEELIGER, U. Influência da luz sobre o crescimento e a produção de biomassa de *Ruppia maritima* L. em cultivo experimental. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 1, p. 31-36, 2006.

COLE, T. C. H.; HILGER, H. H.; CARVALHO, F. A. **Filogenia das angiospermas: sistemática das plantas com flores**. (Portuguese translation of: *Angiosperm Phylogeny Poster – Flowering Plant Systematics*), 2016. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1635159/mod_resource/content/1/APG%20IV%202016_Poster_Portugues.pdf>. Acesso em: 12. abr. 2018.

COLETA, M. **Caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de plantas usadas na medicina tradicional pelas suas propriedades sedativas**. 2008. 309 p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Farmacognosia e Fitoquímica) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

COSTA, F. et al. Desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) com tratamento homeopático. **FACIDER Revista Científica**, n. 11, p. 1-9, 2018.

CROMPTON, C. W. et al. The biology of Canadian weeds. 83. *Hypericum perforatum* L. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 68, n. 1, p. 149–162, 1998.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981.

CUPERTINO, M. C. **O conhecimento e a prática sobre homeopatia pela família agrícola**. 2008. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2008.

DEHKORDI, R. M.; YADEGARI, M.; HAMEDI, B. Effect of Temperature, Drought and Salinity Stresses on Germination of *Portulaca oleracea* L., *Trigonella foenum-graecium* L., *Borago officinalis* L. and *Hypericum Perforatum* L. **Advances in Environmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 148-152, 2015.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007.

DONADON, M. F. B. et al. Germination of radish seeds (*Raphanus sativus*) treated with homeopathic drugs. **International Journal of High Dilution Research**, v. 10, n. 36, p. 231-232, 2011.

DUARTE, E. S. M. **Crescimento e teor de óleo essencial em plantas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* tratadas com homeopatia**. 2007. 188p. Tese (Doutorado-Área de Concentração em Fitotecnia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ESPINOZA, F. J. R. Agrohomeopatia: una opción ecológica para el campo mexicano. **La homeopatia de México**, México, v. 70, n. 613, p. 110-116, 2001.

FARIAS, D. S. et al. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos como forma complementar no controle da hipertensão arterial. **Revista de Biologia e Farmácia e Manejo Agrícola**, v. 12, n. 3, p. 1-13, 2016.

FARON, M. L. B. et al. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 193-199, 2004.

FERNANDES, P.; BOFF, P. Ethnobotany of Medicinal Plants Among Family Farmers: Therapeutic Itinerary in the South Plateau of Santa Catarina State. **Cadernos de Desenvolvimento Rural**, v. 14, n. 80, p. 1-13, 2017.

FIGUEIREDO, C. C. et al. Propriedades físico-química da água com preparações homeopáticas. 1. ed. **In: Homeopatia e Água**, v. 3, p. 10-38, 2012.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90-95, 2011.

FONSECA, M. C. M.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R. Efeito de aplicação única dos preparados homeopáticos *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesium carbonicum*, *Natrium muriaticum* e *Silicea terra* no teor de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini. **Cultura Homeopática**, v. 1, n. 14, p. 6-8, 2006.

FORNASIERO, R. B.; BIANCHI, A.; PINETTI, A. Anatomical and ultrastructure observations in *Hypericum perforatum* L. leaves. **Journal of Herbs, Spices e Medicinal Plants**, v. 5, n. 4, p. 21-33, 1998.

GAID, M. et al. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 47-55, 2016.

GAZOLLA-NETO, A. et al. Ação de níveis de luminosidade sobre o crescimento de plantas de maria-pretinha (*Solanum amercanum* Mill.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 88-92, 2013.

GERM, M. et al. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 471-474, 2010.

GIESEL, A.; BOFF, M. I. C.; BOFF, P. Atividade de formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. submetidas a preparações homeopáticas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 445-451, 2012.

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, P. A. S.; BOFF, P.; BOFF, M. I. C. Preparado homeopático de Iosna, *Artemisia vulgaris* L., no manejo de tripés e seu efeito sobre a produção de cebola em sistema orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 16-21, 2010.

GONÇALVES, P. A. S.; BOFF, P.; VIEIRA NETO, J. Altas diluições no rendimento de rúcula, sala e *Gypsophila elegans*. **Revista Thema**, v. 15, n. 2, p. 521-530, 2018.

GREESON, J. M.; SANFORD, B.; MONTI, D. A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology**, v. 153, n. 4, p. 402-414, 2001.

HAHNEMANN, S. **Organon Da Arte De Curar**. Tradução para o Português da 6ª Ed. alemã. S. Paulo: G.E.H Benoit Mure, 2007.

HERRAIZ, T.; GUILLÉN, H. Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

HOSTANSKA, K. et al. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 121-132, 2003.

HUSSAIN, S.; ANSARI, Z. H.; ARIF, M. Hyperforin: a lead for antidepressants. **International Journal of Health Research**, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2009.

JENDŽELOVSKÁ, Z. et al. Hypericin in the Light and in the dark: two sides of the same coin. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 560, p. 1-20, 2016.

KARIOTI, A.; BILIA, A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 562-594, 2010.

KARPPINEN, K. **Biosynthesis of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. (st. John's wort) - precursors and genes Involved**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Biologia) - Faculdade de Ciência, Universidade de Oulu, Finlândia.

KASPER, R. et al. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 747-765, 2010.

KLADAR, N. et al. Ecologically and ontogenetically induced variations in phenolic compounds and biological activities of *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*, Hypericaceae. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 703-705, 2015.

KLADAR, N. et al. *Hypericum perforatum*: synthesis of active principles during flowering and fruitification – novel aspects of biological potential. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

KOLISKO, E.; KOLISKO, L. **Agriculture of tomorrow**. 2^a ed. England: Acorn Press., 1978. 321p.

KOSUTH, J. et al. The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. **Plant Science**, v. 165, n. 3, p. 515-521, 2003.

KOSUTH, J. et al. The hyp-1 gene is not a limiting factor for hypericin biosynthesis in the genus *Hypericum*. **Functional Plant Biology**, v. 38, p. 35–43, 2011.

KUBIN, A. et al. Hypericin-the facts about a controversial agent. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 2, p. 233–253, 2005.

LATHOUD, J. A. **Estudos de matéria médica homeopática**. 3^a ed. São Paulo: Editora Organon, 2010. 1192 p.

LI, W.; FITZLOFF, J. F. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. **Journal of Chromatography**, v. 765, n. 1, p. 99–105, 2001.

LINDE, K. St. John's Wort - an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 3, p. 146–155, 2009.

MACCHIA, N.; BENVENUTI, A.; ANGELINI, L. Germination characteristics of some seeds of medicinal plants. **Rastitel'nye-Resursy**, v. 21, p. 461-463, 1983.

MARTINEZ-POVEDA, B.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, n. 2, p. 97–103, 2005.

MAŠKOVIĆ, P. Z. et al. Phenolic content, antioxidant and antifungal activities of acetonetic, ethanolic and petroleum ether extracts of *Hypericum perforatum* L. **Hemijska industrija**, v. 65, n. 2, p. 159-164, 2011.

MELO, K. N. M.; BORTOLIN, G. S.; SILVA, A. C. F. Estudo da germinação de sementes de *Aster squamatus* (Spreng.) Hiero. E *Pterocaulon polystachyum* DC. **Revista Científica Rural**, v. 18, n. 1, p. 29-41, 2016.

MILEVSKAYA, V. V. et al. Extraction and determination of biologically active components of St. John's Wort and its pharmaceutical preparations. **Zhurnal Analiticheskoi Khimii**, v. 71, n. 7, p. 768-774, 2016.

MISKOVSKY, P. Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 1, p. 55-84, 2002.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 21, p. 24-40, 1999.

MOSSBERG, B.; STENBERG, L. **Den Nya Nordiska Floran**. Norge: Bonnier Fakta, 2010.

MUELLER, S. C. et al. Effect of St John's wort dose and preparations on the pharmacokinetics of digoxin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 6, p. 546-57, 2004.

NCCAM. National Center for Complementary and Alternative Medicine. **St. John's wort fact sheet (publication Z-02)**. National Institutes of Health, Bethesda, 1999.

NUNES, A. et al. Preparados homeopáticos no cultivo de plantas medicinais. In: I Jornada Agroecológica do Planalto Norte Catarinense, 2018, Canoinhas. **Anais eletrônicos...** Canoinhas: IFSC Campus Canoinhas, 2018. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/joagro/92283-preparados-homeopaticos-no-cultivo-de-plantas-medicinais>>. Acesso em: 11 out. 2018.

NÖR, C. **Análise química e taxonômica de espécies de Hypericum e avaliação da atividade antiangiogênica**. 2006. 186 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PANDA, S. S.; MOHANTY, S.; DHAL, N. K. Effects of Potentised Homeopathic Medicines on the Germination, Growth and Photosynthetic Activity of *Pisum Sativum* L. **Recent Research in Science and Technology**, v. 5, n. 4, p. 11-14, 2013.

PENG, Y.; YUAN, J.; YE, J. Determination of active components in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Electroanalysis**, v. 17, n. 12, p. 1091-1096, 2005.

PÉREZ-GARCÍA, F. et al. *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 53, 1187–1198, 2006.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília, 1985. 289p.

RBG KEW. Royal Botanic Gardens Kew. **Seed Information Database (SID)**. 2008. Version 7.1. Available from: <http://data.kew.org/sid/>. Acesso em: 17 de abr. 2018.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 02 out. 2018.

REBOUÇAS, P. M. et al. Radiação solar e temperatura do ar em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 2, p. 115-125, 2015.

RESENDE, R. F. **Produção de biomassa e óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em diferentes épocas, ambientes de cultivo e tipos de adubação**. 2010. 30 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RIBEIRO FILHO, A. **Repertório de Homeopatia**. 2ª ed. São Paulo: Editora Organon, 2014. 1900 p.

ROBSON, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Infrageneric classification. Bulletin of the British Museum (Natural History). **Botany series**, v. 5, n.6, p. 293-355, 1977.

ROBSON, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 9. Addenda, corrigenda, keys, lists and general discussion. **Phytotaxa**, v. 72, p. 1–111, 2012.

ROLIM, P. R. R. et al. Tratamento de sementes de tomate com medicamentos homeopáticos. In: **Congresso brasileiro de olericultura**, 48, 2006. Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2006.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

ROSE, F. **The Wild Flower Key: How to identify wild flowers rees and shrubs in Britain and Ireland**. Frederick Warne, 2006. 576 p.

RUSSO, E. et al. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug–drug interactions. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 643–655, 2013.

SADDIQU, Z.; NAEEM, I.; MAIMOONA, A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 3, p. 511–521, 2010.

SANTOS, B. M. M.; ROSITO, J. M. Uso de plantas medicinais como instrumento de conscientização: responsabilidade social e ambiental. **Revista Monografias Ambientais**, v. 7, n. 7, 1478-1491, 2012.

SCALON, S. P. Q. et al. Temperatura, luz e substrato na germinação de sementes de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangulares* Cham. Et Schl.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 32-38, 2007.

SCHEMPP, C. M. et al. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multi resistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. **Lancet**, v. 353, v. 9170, p. 2129, 1999.

SCHEMPP, C. M. et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 8, p. 1242-1250, 2002.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4 ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.

SILVA, H. A. et al. The effect of high dilutions of *Pulsatilla nigricans* on the vigour of soybean seeds subjected to accelerated aging. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 201-206, 2012.

SILVA, M. M. et al. Altas diluições para promover a emergência de plântulas de soja. In: Congresso de Homeopatia nas Ciências Agrárias e do Ambiente, 2018, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos...** Ribeirão Preto: Hotel Nacional Inn, 2018. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/1RA4u5LiyjqwCoa1CaB9OHuC4vlRsWWvo/edit>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

SILVA, W. R. G. et al. The ultra high dilutions and its virtual structures. **Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren**, v. 46, n. 10, p. 614-618, 2005.

SNOW, J. M. *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). **The Protocol Journal of Botanical Medicine**, v. 2, p. 16-21, 1996.

SOSA, S.; et al. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 703–709, 2007.

SOUTHWELL, I. A.; BOURKE, C. A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum*. L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 437-441, 2001.

STAMENKOVIĆ, J. et al. Optimization of HPLC method for the isolation of *Hypericum perforatum* L. methanol extract. **Biologica Nyssana**, v. 4, n. 1-2, p. 81-85, 2013.

SZEGEDI, A. et al. Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. **British Medical Journal**, v. 330, n. 7490, p. 503-508, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TEIXEIRA, G. C. S.; BELTRÃO, D. S.; EVANGELISTA, A. W. P. Estudos de evapotranspiração em casa de vegetação. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 520-530, 2011.

TEWARI, N. et al. Developing a new high performance thin layer chromatography method for quantitative estimation of Hyperforin in *Hypericum perforatum*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 16, p. 303-307, 2008.

TICHAVSKÝ, R. **Homeopatía para las plantas**. Monterrey, Nuevo Leon: Fujimoto, Centro Universitario Comenius, 2009. 236 p.

UZBAY, T. et al. Extract of *Hypericum perforatum* blocks nicotine-induced locomotor activity in mice. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 31-40, 2006.

VAN WYK, B. V.; OUDTSHOORN, B. V.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. 2 ed. Pretoria, Briza Publications, 2002. 336 p.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

WAGNER, G. A. Tratamento de depressão no idoso além do cloridrato de fluoxetina. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 49, n. 20, p. 1-5, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Genebra, 2017.