

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO MEDICAMENTO  
HOMEOPÁTICO *ANTIMONIUM CRUDUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**RENATA ROSSETTINI PALOMBO PEDRO**

**SÃO PAULO**

**2017**

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO MEDICAMENTO  
HOMEOPÁTICO *ANTIMONIUM CRUDUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof(a). Dr(a). Leoni Villano Bonamin.

**RENATA ROSSETTINI PALOMBO PEDRO**

**SÃO PAULO**

**2017**

Pedro, Renata Rossetini Palombo.

Caracterização físico-química e ultra-estrutural do medicamento homeopático Antimonium crudum / Renata Rossetini Palombo Pedro. - 2017.

45 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin.

1. Análise físico-química. 2. Antimonium crudum. 3. Homeopatia. I. Bonamin, Leoni Villano. (orientadora). II. Título.

**RENATA ROSSETTINI PALOMBO PEDRO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
ULTRAESTRUTURAL DO MEDICAMENTO  
HOMEOPÁTICO *ANTIMONIUM CRUDUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ORIENTADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin  
Universidade Paulista-UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana Barbosa Suffredini  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Irene Waisse de Priven  
Pontifícia Universidade Católica (PUC)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por conceder o dom da vida e por permitir que eu chegasse até aqui.

À minha família por me apoiar nos meus grandes projetos. Ao meu marido Juvenal Pedro que suportou comigo todas as dificuldades desta etapa.

À professora e orientadora Leoni V. Bonamin por me acolher neste novo desafio da minha vida

À professora Ivana Suffredini por oferecer sua estrutura laboratorial para a execução de parte importante do projeto. Ao Dr. Steven Cartwright que sempre esteve disponível para nos responder às dúvidas sobre a técnica da espectrofotometria de corantes solvatocrômicos.

Às minhas queridas amigas Sandra e Michelle, que sempre acreditaram em mim e incentivaram durante todo o processo do Mestrado.

Aos demais professores e funcionários do Centro de Pesquisa da UNIP que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta dissertação.

Agradecemos ao programa CAPES-PROSUP pela bolsa oferecida (processo: 15846666) para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Introdução: O principal desconforto em relação à homeopatia está relacionado ao seu mecanismo de ação e embora existam muitas hipóteses sobre como o medicamento homeopático age no organismo ainda há lacunas a serem preenchidas. Objetivo: Correlacionar os padrões de efeitos biológicos já descritos com os padrões físico-químicos do *Antimonium crudum* (AC), a fim de lançar uma pista sobre o estudo dos mecanismos de ação. Métodos: *Antimonium crudum* foi utilizado nas diluições 6 cH, 30 cH e 200 cH para verificar a morfologia das partículas presentes no sistema dinamizado por meio de microscopia eletrônica de varredura e também da condutividade das amostras. O padrão de cada diluição também foi analisado através da interação entre os sistemas homeopáticos e os corantes solvatocrômicos (ET33 e BDN) pela leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-visível. Resultados: A análise morfológica de amostras de *Antimonium crudum* no microscópio eletrônico de varredura revelou que o tamanho e o número de micropartículas eram menores em 30 cH do que em 6 cH, sendo que a maioria em forma de meia-lua. No entanto, a dinamização de 200 cH apresentou grandes (mas pouco frequentes) aglomerados dessas partículas. A condutividade foi menor no veículo (30% de álcool), em comparação com as potências (diluições homeopáticas) 6 cH, 30 cH e 200 cH ( $p=0,001$ ), sendo a condutividade em 200 cH superior às demais potências ( $p=0,008$ ). Os resultados apontam para a possibilidade de eventuais efeitos inespecíficos na fagocitose nos casos de estudos *in vitro*. Os dados obtidos da espectrofotometria revelam que houve aumento nos picos de absorbância em comprimentos de onda determinados para cada corante quando comparamos os medicamentos nas potências 30 cH e 200 cH e os controles (água pura e água dinamizada). A potência 6 cH mostrou efeitos similares aos controles. Discussão e conclusão: Os dados obtidos na condutância e na espectrofotometria corroboram a hipótese de interação eletrônica entre as moléculas de água das preparações. Assim sendo, a avaliação global dos resultados sugere a existência de um marcador eletrônico associado aos efeitos biológicos de altas diluições de *Antimonium crudum* e reforça a necessidade de mais estudos sistemáticos sobre tais variáveis.

Palavras-chave: Homeopatia. Condutância. Marcador eletrônico. *Antimonium crudum*.

## ABSTRACT

Introduction: The main discomfort regarding homeopathy is related to its mechanism of action and, although there are many hypotheses about how the homeopathic medicine acts in the body, there are still gaps to be filled. Objective: To correlate the biological effects patterns already described with the physicochemical patterns of *Antimonium crudum* (AC), in order to throw some clues to the study of the mechanisms of action. Methods: *Antimonium crudum* was used in the dilutions 6 cH, 30 cH and 200 cH to verify the morphology of the particles present in the dynamized system, by means of scanning electron microscopy and also the conductivity of the samples. The standards of each dilution were also analyzed through the interaction between homeopathic systems and solvatochromic dyes (ET33 and BDN) by reading the absorbance in the UV-visible spectrophotometer. Results: The morphological analysis of *Antimonium crudum* samples in the scanning electron microscope revealed that the size and number of microparticles were smaller in 30 cH than in 6 cH, most of them in the form of a half-moon. However, AC 200 cH presented large (but uncommon) clusters of these particles. The conductivity was lower in the vehicle (30% alcohol), compared to the potencies (homeopathic dilutions) 6 cH, 30 cH and 200 cH ( $p=0.001$ ), the conductivity being 200 cH higher than the other potencies ( $p=0.008$ ). The results point to the possibility of possible non-specific effects on phagocytosis, in the case of *in vitro* studies. The data obtained from spectrophotometry revealed that there was increase in the absorbance peaks at wavelengths determined for each dye when comparing the drugs in the potencies 30 cH and 200 cH and the controls (pure water and dynamic water). Potency 6 cH showed similar effects to controls. Discussion and conclusion: The data obtained by conductance and spectrophotometry methods corroborate the hypothesis of electronic interaction among the water molecules. Thus, the overall evaluation of the results suggests the existence of an electronic marker associated with the biological effects of high dilutions of *Antimonium crudum* and reinforces the need for more systematic studies on such variables.

Keywords: Homeopathy. Conductance. Electronic marker. *Antimonium crudum*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação das técnicas de diluição. A imagem (A) representa a técnica de diluição decimal de Hering representada por (D, DH); A imagem (B) representa a técnica Hahnemaniana de diluição centesimal, representada por (C, CH).....	13
<b>Figura 2.</b> Montagem do suporte dos eletrodos. Usado para medida da condutividade das amostras de medicamentos.....	22
<b>Figura 3.</b> Espectrofotômetro. Utilizado na análise de polaridade por corantes solvatocrômicos. As amostras representadas estão imersas no corante ET33. ....	24
<b>Figura 4.</b> Filtragem do corante ET33 em fluxo laminar. Após a filtragem, o mesmo foi mantido embalado em papel alumínio até o momento do uso. ....	25
<b>Figura 5.</b> Box-plot representando a frequência relativa de diferentes elementos químicos. Análise da distribuição dos diferentes elementos entre as partículas identificadas no sedimento dos medicamentos analisados e na amostra de água pura, usada na diluição final das preparações homeopáticas. ....	29
<b>Figura 6.</b> Ultraestrutura das partículas em fotomicrografias digitais obtidas pelo MEV JEOL 6510®. Aumento de 10 µm do sedimento dos medicamentos analisados colhidos a partir da centrifugação dos mesmos. A numeração em azul representa os pontos selecionados ao acaso para a caracterização da composição química das partículas pelo sistema EDS. ....	30
<b>Figura 7.</b> Fluxo de corrente elétrica nos medicamentos (µA). Medida pela imersão de eletrodos positivo e negativo acoplados a microamperímetro (Ryodoraku®) nas amostras de medicamentos (N=9). ....	32
<b>Figura 8.</b> Varredura das absorbâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras, diluídas em <b>BDN (A)</b> ou em <b>ET33 (B)</b> medidas em espectrofotômetro. ....	33
<b>Figura 9.</b> Pico amplificado das absorbâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras diluídas em <b>BDN (A)</b> ou em <b>ET33 (B)</b> medidas em espectrofotômetro. ....	34
<b>Figura 10.</b> Pico de absorbâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras diluídas em <b>BDN (A)</b> ou em <b>ET33 (B)</b> e suas variações em função da presença de diferentes potências de <i>Antimonium crudum</i> ou de seus controles. *ANOVA, Tukey, $F(5, 12) = 8,128$ ; $p=0,001$ , $\eta^2 = 0,772$ para BDN e $F(3, 4.01) = 49,019$ ; $p=0,001$ , $\eta^2 = 0,932$ para ET 33. ....	36

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Análise da frequência relativa de diferentes elementos químicos na composição das micropartículas encontradas no sedimento de água, *Antimonium crudum* 6 cH, 30 cH e 200 cH, após ultracentrifugação. As análises foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6510®) seguida de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) para identificação dos elementos de superfície. Os valores estão representados pela porcentagem de partículas que apresentavam cada um dos elementos (N=15-30). .....28

**Tabela 2.** Fluxo de corrente elétrica no líquido em microampères ( $\mu\text{A}$ ). Medida a partir do veículo (álcool de cereais 30%) e *Antimonium crudum* nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH. <sup>##</sup>  $p = 0,0001$  em relação às demais amostras; <sup>#</sup>  $p = 0,007$  em relação ao *Antimonium crudum* 6 cH (AC 6 cH) e *Antimonium crudum* 30 cH (AC 30 cH) (ANOVA, Tuckey-Krammer). A última coluna representa o controle ambiental. .31

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC.....	<i>Antimonium crudum</i>
cH.....	centesimal de Hahnemann
ET33.....	(2,6-Dicloro-4- (2,4,6-trifenil-piridinium-1-il) -fenolato)
BDN.....	((4- (Bis- (4- (dimetilamino) fenil) metileno) -1 (4H) -naftalenona)
UV-visível.....	região do ultravioleta e do visível
M.....	Molar
UHD`s.....	ultradiluições
NPs.....	nanopartículas
MTT.....	[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio]
$\mu$ A.....	microampères

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 Histórico .....	12
1.2 Ultradiluições.....	13
1.3 Hipóteses .....	14
1.4 <i>Antimonium crudum</i> .....	17
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>19</b>
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Ética .....	20
3.2 Fracionamento e análise da água pura .....	20
3.3 Preparo das ponteiras .....	20
3.4 Preparo dos sistemas homeopáticos .....	21
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) (JEOL 6510®) .....	21
3.6 Análise da intensidade de corrente elétrica.....	22
3.7 Análise da polaridade por corantes solvatocrômicos e espectroscopia de luz visível .....	23
3.8 Análise estatística .....	26
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) (JEOL 6510®) .....	27
4.2 Análise intensidade de corrente elétrica.....	30
4.3 Análise da polaridade por corantes solvatocrômicos e espectroscopia de luz visível .....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

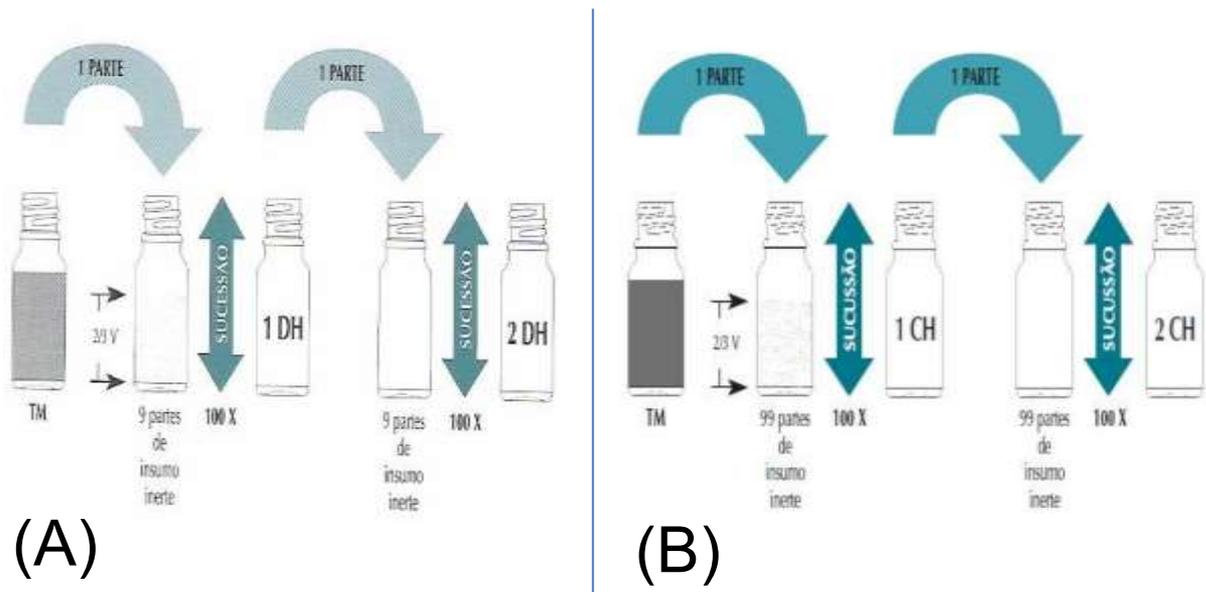
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A palavra homeopatia vem do grego (*homoios* = semelhante e *pathos* = doença) e traz em si o conceito que é a base desta ciência, o princípio proposto por Hipócrates “*similia similibus curantur*”, ou seja, “semelhante cura semelhante”. Criada por Christian Friederich Samuel Hahnemann, a homeopatia foi inicialmente organizada como uma doutrina. Mesmo assim nasce com conceito inovador: o uso de doses extremamente diluídas capazes de capturar o “espírito medicinal” da substância de origem. Mesmo quebrando paradigmas tal ideia foi inspirada nos conceitos tradicionais da alquimia (Bonamin, 2016).

Os efeitos terapêuticos das drogas homeopáticas, mesmo em doses ultradiluídas, têm sido demonstrados em estudos experimentais (Bonamin, 2015; Endler *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2016; Bagai *et al.*, 2014, Rodrigues de Santana, *et al.*, 2014). Contudo, dada a sua particular farmacotécnica chamada de “dinamização”, a qual é baseada na diluição seriada centesimal (C, CH), ou decimal (D, DH), seguida por agitação vertical e rítmica repetida 100 vezes (de forma manual ou mecânica, **Figura 1**), a homeopatia ainda causa desconfiança na sociedade científica (Pakpoor J, 2015) pois, muitas vezes, as diluições ultrapassam o número de Avogadro.

Dessa forma, o principal desconforto em relação à homeopatia está relacionado ao seu mecanismo de ação, pois, como já sabido, acima de doze diluições seriadas centesimais de uma preparação a 1 Molar (1 M), também representado por 12 cH, matematicamente não seria mais possível identificar moléculas da droga inicial responsável por promover qualquer ação farmacológica clássica. Assim, a grande questão acerca da homeopatia é: como estas diluições, cada vez mais distantes do número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$ ) são capazes de promover respostas biológicas que levam ao retorno da homeostase corporal, e quais os mecanismos envolvidos neste processo? Foi este terreno de dúvidas que nos motivou a trabalhar sobre as hipóteses atualmente propostas para explicar os possíveis mecanismos destas preparações.



Fonte: Google imagens, 2017 - <https://goo.gl/5vgjHn>.

**Figura 1.** Representação das técnicas de diluição. A imagem (A) representa a técnica de diluição decimal de Hering representada por (D, DH); A imagem (B) representa a técnica Hahnemaniana de diluição centesimal, representada por (C, CH).

## 1.2 Ultradiluições

Daqui em diante não se usará mais a palavra homeopatia para se referir às preparações que ultrapassaram ou estão muito próximas do número de Avogadro. Passar-se-á então a chamá-las de ultradiluições (UHDs) que conceitualmente indicam soluções com doses infinitesimais impossíveis de serem quantificadas. Assim sendo, aceitamos que não se pode quantificar o número de moléculas presentes nas UHDs e, conseqüentemente, deixamos de lado o conceito de chave e fechadura da farmacologia clássica, onde a presença de uma molécula se faz imprescindível para buscar uma nova forma de entender como as UHDs atuam nos organismos vivos. Possivelmente a explicação que tanto buscamos esteja no comportamento físico-químico destas preparações, em especial do solvente utilizado nas dinamizações. Por isso sua compreensão requer, antes de mais nada, um olhar diferente.

É através da “Teoria dos Significados Corporais” (TSC) proposta por Madeleine Bastide e Agnès Lagache em meados dos anos 80, e dos conceitos de

semiótica de Charles S Pierce, do início do século XX, que podemos construir uma base de raciocínio sobre como as UHDs poderiam interagir com o sistema biológico. A TSC trata exatamente sobre formas de comunicação entre sistemas vivos que não se referem nem à comunicação verbal (simbólica), nem à comunicação mecanicista (troca de moléculas entre compartimentos) (Bonamin *et al.*, 2008). A concepção desta teoria facilitou muito a construção de modelos e desenhos experimentais, uma vez que o estabelecimento do conceito de “mediador” da comunicação, possivelmente de natureza não química, abriu espaços para o estudo minucioso das propriedades físicas do solvente usado nas UHDs e nas vias de sinalização intracelulares que poderiam sofrer interferências pelas mesmas. Em resumo, como as UHDs poderiam agir nos sistemas vivos? Seriam elas realmente capazes de restabelecer a comunicação harmônica entre os diferentes constituintes celulares? Desempenhariam, de fato, este papel de reequilibrar ou interferir nas comunicações endógenas? Diversas hipóteses têm sido investigadas nesse momento.

### 1.3 Hipóteses

A formulação de hipóteses é um passo fundamental para conseguirmos, talvez, uma pista sobre como esta transferência de informação é passada aos sistemas vivos. Precisar-se-á estudar as propriedades físico-químicas do soluto e do solvente, entender suas características e como se comportam quando juntos, num sistema líquido, entender como buscam o equilíbrio e, por fim, como interferem nos sistemas biológicos a fim de produzir um estímulo capaz de indicar novamente a retomada do equilíbrio perdido (Bellavite *et al.*, 2014 a,b).

O fenômeno da epitaxia, conhecido como a transmissão de informação através da sobreposição do substrato sobre uma estrutura molecular modificada, é uma das hipóteses que procura explicar a homeopatia em função da sílica liberada dos frascos de vidro borossilicados durante o processo de dinamização, a qual seria capaz de interagir com diversas proteínas, partículas em suspensão e células, conduzindo, assim, a informação da substância inicial para as células. Porém, esse tema ainda é pouco explorado nos estudos sobre homeopatia (Bell *et al.*, 2015). Ocorre que tais complexos seriam progressivamente removidos ao longo das diluições. Assim, podemos hipotetizar que a sílica *per se* talvez não seja responsável

pelo carregamento das informações e, sim, que mudanças eletrônicas da molécula do solvente, provavelmente a água, sejam capazes de organizar as moléculas em padrões estáveis, de acordo com o substrato diluído, embora as ligações entre elas sejam, *per se*, extremamente instáveis (Elia *et al.*, 2014).

De acordo com Dalboni (2016), a “hipótese da sílica” perde força pois, em seu trabalho, demonstrou-se que mesmo em preparações onde partículas de sílica não foram identificadas na solução, o efeito biológico do arsênico ultradiluído foi observado em ensaios sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*. Por outro lado, Chickramane *et al.* (2010, 2017) concluíram que, de acordo com a quantidade de dinamizações, as nano-partículas (NPs) apresentam tamanhos irregulares, sendo capazes de produzir efeitos característicos de hormesis (curva dose-efeito em forma de sino) em células mantidas em cultura, verificados pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio), a partir de diferentes medicamentos, em diferentes potências. Contudo, a hipótese do grupo de Chickramane ainda guarda reservas, pois não há evidência de especificidade de efeitos segundo a matéria-prima de partida.

A agitação pela qual a preparação é submetida promove a movimentação “desordenada” das moléculas de água e favorece a formação de nanobolhas que, embora se formem espontaneamente durante a dinamização, apresentam um papel crucial na interação entre o soluto e o solvente. Segundo Demangeat (2015), as nanobolhas acabam por “envolver” o soluto formando o que ele chama de “superestruturas”, as quais se organizam durante o processo de dinamização, “protegendo-o” entre as moléculas de água e, portanto, propagando a informação do mesmo através das diluições.

Recentemente outras evidências têm sido mostradas sobre as propriedades dielétricas da água, em especial sobre mudanças nos padrões de eletrocondutividade do veículo após o processo de dinamização (Elia *et al.*, 2014; Verdel *et al.*, 2012). Tomando por base que cada substância diluída tem uma característica própria e que a característica do soluto será sempre a mesma, possivelmente a resposta almejada esteja começando a ser desvendada. Podemos supor que o soluto imprima no solvente uma “marca própria”. Mas, lembrando que acima da potência de 12 cH não encontramos mais nenhum vestígio do soluto, de que marca estaríamos falando? Podemos propor, então, que quem carregaria a informação a

partir do soluto diluído seriam as partículas diversas encontradas nestas soluções e/ou os próprios *clusters* de água (ou nano-estruturas) formados no processo de dinamização. Mesmo sendo estes *clusters* instáveis e efêmeros, seus padrões de organização podem ser constantes (Fedorets *et al.*, 2017). Comparativamente, a membrana plasmática celular é uma estrutura dinâmica, em contínuo processo de renovação, e seus constituintes ligam-se e desligam-se a todo momento. Mas sua organização básica é invariante ao longo de toda a vida da célula.

Todas estas hipóteses têm lacunas e falhas na explicação do processo de transferência da informação e, então, ao voltarmos a olhar para o soluto, a única substância que muda em cada preparação homeopática, podemos começar a pensar numa possível “marca eletrônica” impressa no solvente. Essa é a base da hipótese de Steven Cartwright (2016; 2017). Importante notar que “marca eletrônica” é totalmente diferente do conceito de energia ou entrelaçamento quântico, que muito já foi discutido para explicar a ação das UHDs nos sistemas biológicos (Molski, 2010; Schulte, 2015). É preciso retomar os conceitos básicos da física sobre elétrons, como eles se distribuem espacialmente e como conferem a cada elemento químico uma carga eletrônica específica, podendo as moléculas serem mais positivas ou mais negativas em função de suas interações; pois, de acordo com essa hipótese, são estes elétrons que irão definir o comportamento de ligação de cada elemento ou substância com o solvente utilizado (no caso dos medicamentos homeopáticos, uma solução hidro-alcoólica ou a própria água). Da mesma forma esses elétrons devem definir o comportamento do solvente em si, quando em diluições acima do número de Avogadro, em relação ao meio aquoso das estruturas biológicas que estão em contato. No caso do modelo de Cartwright, os corantes polares substituiriam o meio aquoso celular nessas interações, acusando tais mudanças eletrônicas por alterações de cor, perceptíveis em um espectrofotômetro suficientemente sensível.

Segundo Cartwright (2016; 2017) podemos definir o padrão de cada UHD utilizada através da espectroscopia UV-visível, apoiada no uso de corantes solvatocrômicos ou polares que apresentam sensibilidade suficiente para demonstrar diferença nos espectros de absorbância, mesmo que esta seja mínima. Tal sensibilidade é possível pois os corantes apresentam algum grupo de elétrons que conferem polaridade variável à molécula. A presença de grupamentos doadores ou aceptores, como ocorre nos corantes solvatocrômicos, é uma outra característica

igualmente sensível, mas não obrigatória para identificar padrões do solvente. É então através da interação entre a nuvem de elétrons destes corantes e as diferentes potências das UHD's que são visualizadas diferenças nos espectros de absorbância. Trata-se de um método de baixo custo e de fácil execução, o que o torna muito interessante (Cartwright, 2017).

#### **1.4 *Antimonium crudum***

O *Antimonium crudum* é obtido a partir do mineral sulfeto de antimônio ( $Sb_2S_3$ ), encontrado em rochas na França e preparado como matriz homeopática segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira 3ª Ed (ANVISA, 2011). A escolha do *Antimonium crudum* para toda a série de estudos foi feita respeitando o conceito de *gênio epidêmico*, ou seja, a escolha do medicamento cuja patogenesia contempla grande parte dos sintomas de uma determinada população doente, no caso, a leishmaniose cutânea.

Os estudos prévios obtidos pelo nosso grupo mostraram que a administração de *Antimonium crudum* 30 cH em camundongos BALB-c foi capaz de reduzir significativamente o processo inflamatório provocado pelo parasito no local da infecção (Santana *et al.*, 2014). Tal resultado foi explicado em estudos subsequentes *in vitro*, em que co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania amazonensis* mostraram inibição no pico de MCP-1 após o tratamento das mesmas com *Antimonium crudum* 30 cH. Os efeitos do *Antimonium crudum* 200 cH se mostraram ainda mais interessantes pois, embora tenha-se observado o espraiamento do macrófago nas primeiras horas, o principal resultado obtido foi o aumento exponencial e tardio da produção de VEGF, o que indica provável polarização dos macrófagos de M1 para M2 (Rodrigues de Santana *et al.*, 2017). Curiosamente, o *Antimonium crudum* 6 cH não produziu efeitos significativos nesse modelo experimental (Santana *et al.*, 2016). Outros trabalhos com diferentes UHD's também demonstram efeitos modulatórios no sistema imune frente à infecção com diferentes espécies de *Leishmania* (Nascimento *et al.*, 2017 e Cajueiro *et al.*, 2017), o que fortalece a ideia de que a interação do organismo com diferentes potências homeopáticas leva a modificações importantes na evolução da infecção e de processos biológicos relacionados.

A consistência entre os resultados obtidos com *Antimonium crudum in vitro, in vivo* e sua convergência com as indicações clínicas deste medicamento nos motivou a estudar os aspectos físico-químicos do mesmo, nas potências previamente descritas.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é caracterizar eletricamente, espectroscopicamente e ultraestruturalmente diferentes diluições do medicamento homeopático *Antimonium crudum*; bem como correlacionar seus padrões físico-químicos com os padrões de efeitos biológicos já descritos, a fim de lançar uma pista sobre o estudo dos mecanismos de ação envolvidos.

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Ética**

Por se tratar de estudo 100% *in vitro* utilizando apenas análises físico-químicas dos medicamentos, a aprovação do comitê de ética da UNIP não foi necessária (conforme normativas publicadas pelo CONCEA). Declara-se, portanto, que este projeto não envolve o uso de animais.

#### **3.2 Fracionamento e análise da água pura**

Anteriormente a todos os experimentos descritos ocorreu a preparação e análise da água utilizada nas diluições do *Antimonium crudum*.

A água pura, obtida por osmose reversa, foi fracionada em três frascos de vidro com capacidade de 100 mL e levada à autoclave para garantir sua esterilidade. Após este procedimento, a água foi alíquotada novamente em fluxo laminar para ser filtrada e assim ser utilizada na diluição do *Antimonium crudum*. O pH da água foi medido, sendo igual à 7.0.

Análises preliminares da água por microscopia eletrônica determinaram todos os procedimentos realizados em sequência.

#### **3.3 Preparo das ponteiras**

Todas as ponteiras utilizadas foram limpas de micropartículas através da utilização de acetona pura. As ponteiras foram colocadas num frasco Becker e cobertas por acetona pura para passarem pelo sonicador por um período de 30 minutos. Esse procedimento foi capaz de limpar as superfícies contaminadas por micropartículas que possam interferir nos resultados. Após os 30 minutos, as ponteiras foram retiradas da acetona e levadas à capela de fluxo laminar para secar e passar pela luz UV durante 15 minutos, a fim de serem esterilizadas.

### 3.4 Preparo dos sistemas homeopáticos

Para cada experimento foram preparados apenas 10 mL de *Antimonium crudum* em três potências diferentes 6 cH, 30 cH e 200 cH. A preparação do medicamento obedeceu a técnica de diluição Hanemaniana (1:100) utilizando frascos de vidro âmbar, tipo II, conforme padrão estabelecido pelas farmácias homeopáticas comerciais. A fim de garantir precisão nas análises os frascos de vidro foram previamente esterilizados na autoclave e as diluições foram feitas na capela de fluxo laminar para evitar contaminação durante o procedimento.

As matrizes 5 cH, 29 cH e 199 cH foram preparadas em solução hidroalcoólica 30% em farmácia homeopática credenciada na ANVISA. A última diluição foi feita no próprio laboratório de pesquisa, na véspera do experimento, utilizando a água previamente preparada, em condições estéreis e aparelho dinamizador Denise (AUTIC®). Sempre respeitando as normativas da Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3ª edição (2011).

### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) (JEOL 6510®)

A identificação de micropartículas no sistema homeopático foi feita através de análise ultraestrutural em MEV acoplado ao EDS (JEOL 6510®); técnica que consiste na microevaporação das amostras líquidas sobre uma superfície plana, resultando na sedimentação das micropartículas para análise, através da microscopia eletrônica de varredura.

As preparações de *Antimonium crudum* foram alíquotadas, em duplicata, em microtubos plásticos do tipo Eppendorff® com capacidade de 1000 µL. Cada alíquota de 500 µL foi submetida à centrifugação a 10000 rpm por 60 minutos, para sedimentação das micropartículas. Em seguida, foram recolhidos 10 µL do fundo do microtubo de cada amostra e depositado sobre a plataforma plana, denominada *stub*, sem espalhamento da gota.

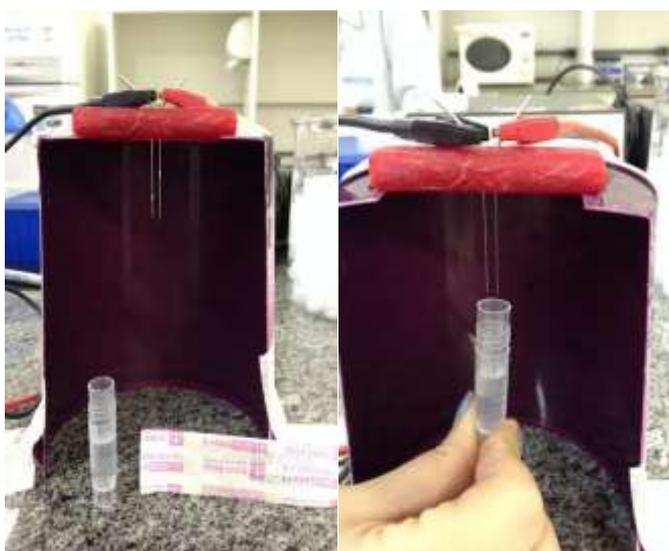
Cada *stub* foi previamente limpo com acetona pura seguindo o mesmo protocolo que as ponteiros junto ao sonicador. Os *stubs* contendo as amostras foram mantidos em uma placa de Petri fechada dentro da estufa de secagem. Após a

completa evaporação do solvente, os *stubs* foram analisados no equipamento MEV/EDS (JEOL 6510<sup>®</sup>), onde 30 partículas por *stub* foram randomicamente selecionadas para análise. As imagens das mesmas foram capturadas em aumento de 10 micrômetros.

### 3.6 Análise da intensidade de corrente elétrica

A leitura da condutividade foi feita através de microamperímetro (Ryodoraku<sup>®</sup>). Para realizar esta técnica é necessário manter telefones celulares e equipamentos eletrônicos distantes do local da medição, pois estes podem interferir na medida da condutividade, segundo informações do fabricante. Assim, os experimentos foram feitos em fluxo laminar, com a menor presença de luz possível, em triplicata, duas a três vezes ao dia. As condições do ambiente (temperatura e umidade) foram monitoradas a cada repetição, sendo constatada sua regularidade.

Para realizar a leitura de condutividade das amostras foi necessário adaptar o aparelho sobre uma base de modo que tivéssemos um padrão da distância e tamanho dos eletrodos. Os eletrodos (30x40mm) foram transfixados em base fixa de cera não condutora (com 1 cm de espessura), ligados aos terminais em “jacaré” do aparelho, os quais foram presos aos canhões dos eletrodos à 45° e mantidos acima da base da cera (**Figura 2**).



**Figura 2.** Montagem do suporte dos eletrodos. Usado para medida da condutividade das amostras de medicamentos.

O aparelho foi calibrado antes de cada experimento. A calibração é feita prendendo um eletrodo ao outro (gerando um curto-circuito) e regulando, através do botão central, a medida de 200  $\mu\text{A}$ . A confirmação da estabilidade das amostras é feita pela medida da condutividade da água pura, que gerou um resultado igual à 100  $\mu\text{A}$ , com desvio de 5%. Seguidos estes passos, o experimento foi iniciado, anotando a temperatura e umidade do fluxo laminar, bem como a hora e data de cada experimento.

Utilizou-se o criotubo de fundo plano contendo a alíquota das amostras até o encaixe perfeito das agulhas, sem que as mesmas tocassem as paredes ou o fundo do tubo. Aguardou-se alguns segundos para estabilizar a medição e anotou-se o valor lido pelo aparelho para cada amostra. No intervalo de cada medição fez-se a limpeza das agulhas por meio de gaze seca para minimizar possíveis interferências entre as amostras. As amostras utilizadas foram: álcool de cereais 30% (veículo), *Antimonium crudum* 6 cH, *Antimonium crudum* 30 cH e *Antimonium crudum* 200 cH.

### **3.7 Análise da polaridade por corantes solvatocrômicos e espectroscopia de luz visível**

A análise físico-química foi feita através do espectrofotômetro (FEMTO 800 XI<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil, **Figura 3**). O espectrofotômetro foi ajustado de acordo com o método descrito por Cartwright (2016). Para isso, a varredura do equipamento foi ajustada entre 350 e 800 nm, com resolução de 1 nm. As condições do ambiente (temperatura e umidade) foram anotadas no início do experimento e a cada meia hora, sequencialmente. As leituras da absorbância foram salvas em planilhas Excel<sup>®</sup> para análise estatística posterior.



**Figura 3.** Espectrofotômetro. Utilizado na análise de polaridade por corantes solvatocrômicos. As amostras representadas estão imersas no corante ET33.

Toda manipulação dos corantes e sua interação com os medicamentos foram feitas em fluxo laminar com a menor presença de luz possível. Somente a leitura das amostras foi realizada fora do fluxo laminar por uma questão prática, mantendo-se a estante com as amostras embaladas em papel alumínio, em uma gaveta fechada, até o momento de cada medida, para evitar o contato das mesmas com a luz, uma vez que os corantes são sensíveis a ela.

Para esta análise optou-se pela utilização de cubetas descartáveis ao invés de cubetas de quartzo, a fim de otimizar o tempo do experimento e reduzir possíveis contaminações entre as amostras. As cubetas descartáveis também passaram por um processo de limpeza antes do uso, onde foram mergulhadas em álcool absoluto e deixadas no sonicador por 15 minutos, para remoção de quaisquer partículas contaminantes que pudessem estar presentes nas suas paredes; posteriormente foram emborcadas no interior do fluxo laminar sobre uma folha de alumínio limpa com álcool 70%, para que secassem antes do experimento.

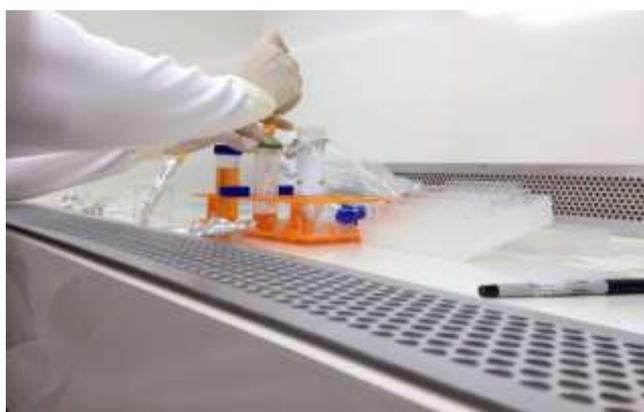
A água pura e o álcool absoluto utilizados neste experimento foram previamente centrifugados por 1 hora a 4000 rpm em tubos de 50 mL, a fim de limitar as partículas consideradas interferentes, descartando-se o sedimento com as partículas mais pesadas. Dessa forma, transferiu-se cuidadosamente, para evitar a movimentação do líquido, 40 mL da fase superior da água e do álcool, conforme o caso, para tubos plásticos estéreis com o auxílio de uma seringa e filtro de 22  $\mu\text{m}$ . Esta água foi, então, utilizada para preparar a última potência das preparações homeopáticas, a partir da matriz comercial preparada em solução hidroalcoólica (ver

item 3.4).

Os dois corantes utilizados foram preparados em fluxo laminar e também filtrados antes do início da análise em filtro de 22  $\mu\text{m}$ , evitando qualquer interferência de particulados (**Figura 4**).

O corante BDN – ((4- (Bis- (4- (dimetilamino) fenil) metileno) -1 (4H) - naftalenona) - (PM = 394,5 g) foi diluído numa solução hidroalcoólica 65%, devido a sua baixa solubilidade em água pura. Foi deixado em repouso por 1 hora, no fluxo laminar, embalado em papel alumínio, até completa dissolução. A concentração final deste corante foi 80  $\mu\text{M}$  (1,9 mg/60 mL). O corante ET33 – (2,6-Dicloro-4- (2,4,6-trifenil-piridínio-1-il) -fenolato) - (PM = 468,3 g) foi diluído em etanol absoluto numa solução 245  $\mu\text{M}$  (6,9 mg/60 mL). As concentrações foram determinadas conforme descrito por Cartwright (2016). O etanol absoluto foi utilizado como “branco” para determinar a linha-base de absorbâncias do equipamento utilizando o mesmo espectro de luz UV visível (350 – 800 nm).

Todas as análises foram feitas em triplicata. Transferiu-se 2,95 mL de cada corante para as cubetas e 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra a ser testada, ou seja, da preparação de *Antimonium crudum* nas potências 6, 30 e 200 cH (feitas em água, na véspera) e respectivos controles: água pura, água pura dinamizada e corante puro. A água utilizada como controle foi obtida do mesmo lote de água pura e processada usada na diluição das matrizes.



**Figura 4.** Filtragem do corante ET33 em fluxo laminar. Após a filtragem, o mesmo foi mantido embalado em papel alumínio até o momento do uso.

### 3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa IBM SPSS, versão 21.0 e o programa GraphPad Prism, versão 6.0, para o Windows™. A normalidade foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e avaliada por inspeção de gráficos quantil-quantil (Q-Q *plot*). A homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene e a correção de Welch foi aplicada à ANOVA em casos de não homogeneidade. Os *outliers* foram avaliados por meio da inspeção do box plot Q-Q e foram removidos se necessário.

Os resultados foram avaliados por meio de ANOVA de uma via com diferentes pós-testes (Dunnett, Tukey ou Games-Howell) dependendo da circunstância. O eta-quadrado parcial ( $\eta^2$ ), uma medida do tamanho do efeito, também foi relatado no caso das absorbâncias. Este parâmetro foi particularmente útil para variáveis apresentando grandes valores de desvio e análises com valores “p” que poderiam levar a erros de tipo I (rejeição de uma hipótese nula verdadeira) ou II (retenção de hipóteses nulas falsas).

O nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0.05$  e os gráficos foram elaborados utilizando o *software* Prism 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) (JEOL 6510®)

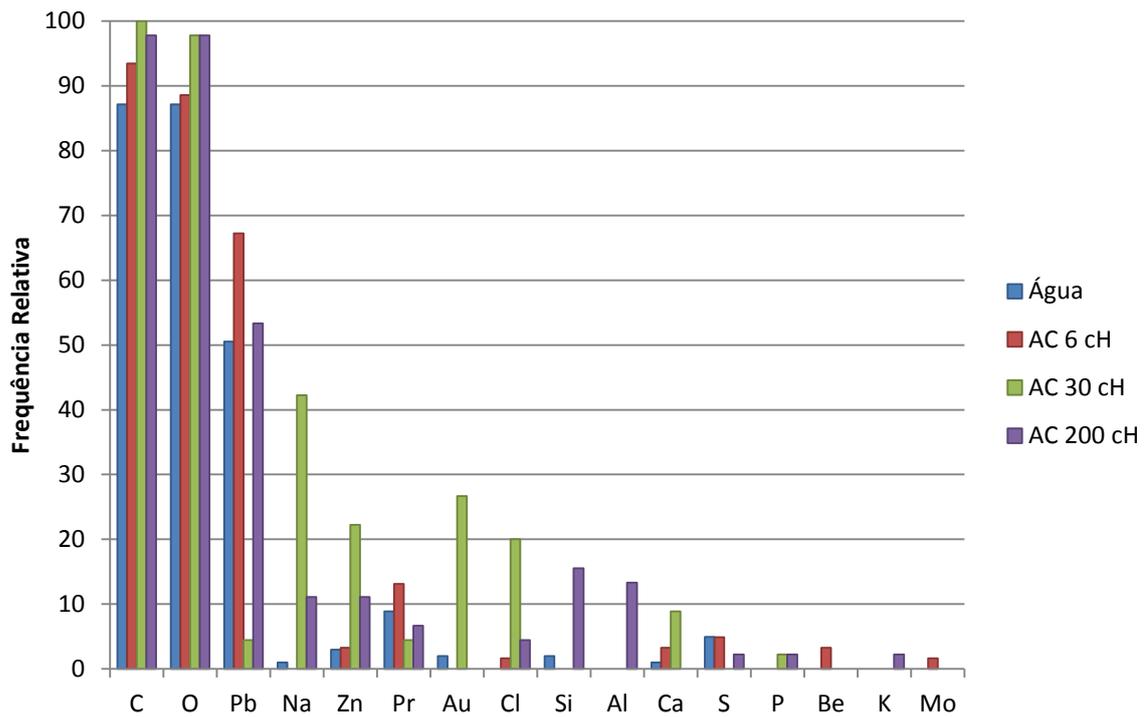
Abaixo se encontram os resultados obtidos no MEV/EDS representados pela porcentagem de átomos presentes nas preparações homeopáticas (**Tabela 1**). Observou-se distribuição randômica de diferentes elementos químicos entre as partículas nos diferentes medicamentos. Não houve predomínio de nenhum elemento específico, em nenhuma amostra analisada, capaz de justificar os resultados obtidos nos ensaios biológicos prévios (Santana *et al.*, 2014, 2017; Nascimento *et al.*, 2017).

A representação gráfica da frequência relativa dos elementos químicos entre as partículas está expressa na **Figura 5**.

As imagens das partículas identificadas sobre os *stubs*, a partir das amostras de água, *Antimonium crudum* 6 cH, 30 cH e 200 cH mostraram grande variação morfológica. Na água pura, foram observadas um grande número de partículas alongadas, em formato de meia-lua. Uma imagem semelhante foi identificada nas amostras de AC 6 cH. A preparação de AC 30 cH, por sua vez, mostrou partículas maiores e mais arredondadas, o que sugere certa aglomeração entre elas ao longo das diluições sucessivas. Da mesma forma, grandes concreções foram vistas no sedimento das preparações de AC 200 cH (**Figura 7**).

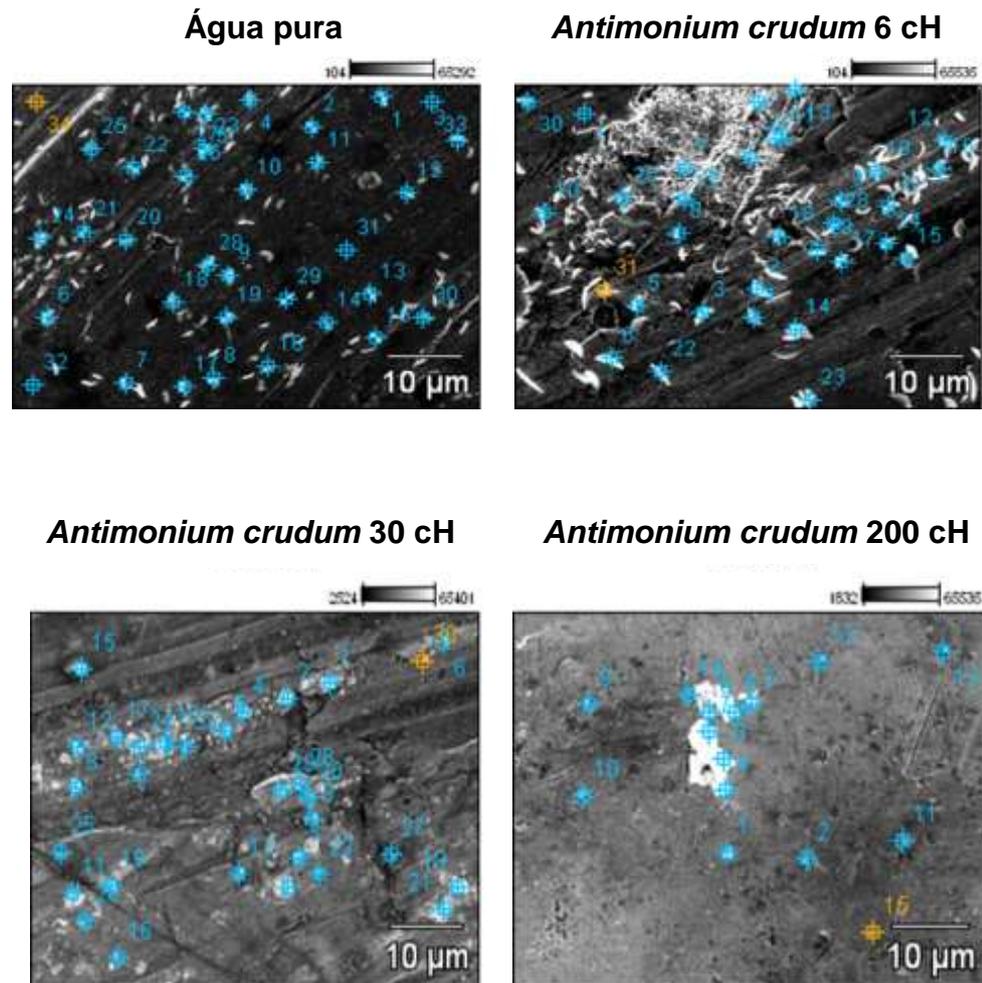
**Tabela 1.** Análise da frequência relativa de diferentes elementos químicos na composição das micropartículas encontradas no sedimento de água, *Antimonium crudum* 6 cH, 30 cH e 200 cH, após ultracentrifugação. As análises foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6510®) seguida de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) para identificação dos elementos de superfície. Os valores estão representados pela porcentagem de partículas que apresentavam cada um dos elementos (N=15-30).

<b>Elemento</b>	<b>Água pura</b>	<b>Ac 6 cH</b>	<b>Ac 30 cH</b>	<b>Ac 200 cH</b>	<b>Média</b>
<b>C</b>	87,13	93,44	100,00	97,78	94,59
<b>O</b>	87,13	88,52	97,78	97,78	92,80
<b>Pb</b>	50,50	67,21	4,44	53,33	43,87
<b>Na</b>	0,99	0,00	42,22	11,11	13,58
<b>Zn</b>	2,97	3,28	22,22	11,11	9,90
<b>Pr</b>	8,91	13,11	4,44	6,67	8,28
<b>Au</b>	1,98	0,00	26,67	0,00	7,16
<b>Cl</b>	0,00	1,64	20,00	4,44	6,52
<b>Si</b>	1,98	0,00	0,00	15,56	4,38
<b>Al</b>	0,00	0,00	0,00	13,33	3,33
<b>Ca</b>	0,99	3,28	8,89	0,00	3,29
<b>S</b>	4,95	4,92	0,00	2,22	3,02
<b>P</b>	0,00	0,00	2,22	2,22	1,11
<b>Be</b>	0,00	3,28	0,00	0,00	0,82
<b>K</b>	0,00	0,00	0,00	2,22	0,56
<b>Mo</b>	0,00	1,64	0,00	0,00	0,41



**Figura 5.** Box-plot representando a frequência relativa de diferentes elementos químicos. Análise da distribuição dos diferentes elementos entre as partículas identificadas no sedimento dos medicamentos analisados e na amostra de água pura, usada na diluição final das preparações homeopáticas.

Dessa forma, o formato e o tamanho das partículas observadas nas diferentes preparações parecem ser mais relevantes na diferenciação dos medicamentos do que sua composição química.



**Figura 6.** Ultraestrutura das partículas em fotomicrografias digitais obtidas pelo MEV JEOL 6510®. Aumento de 10 µm do sedimento dos medicamentos analisados colhidos a partir da centrifugação dos mesmos. A numeração em azul representa os pontos selecionados ao acaso para a caracterização da composição química das partículas pelo sistema EDS.

#### 4.2 Análise intensidade de corrente elétrica

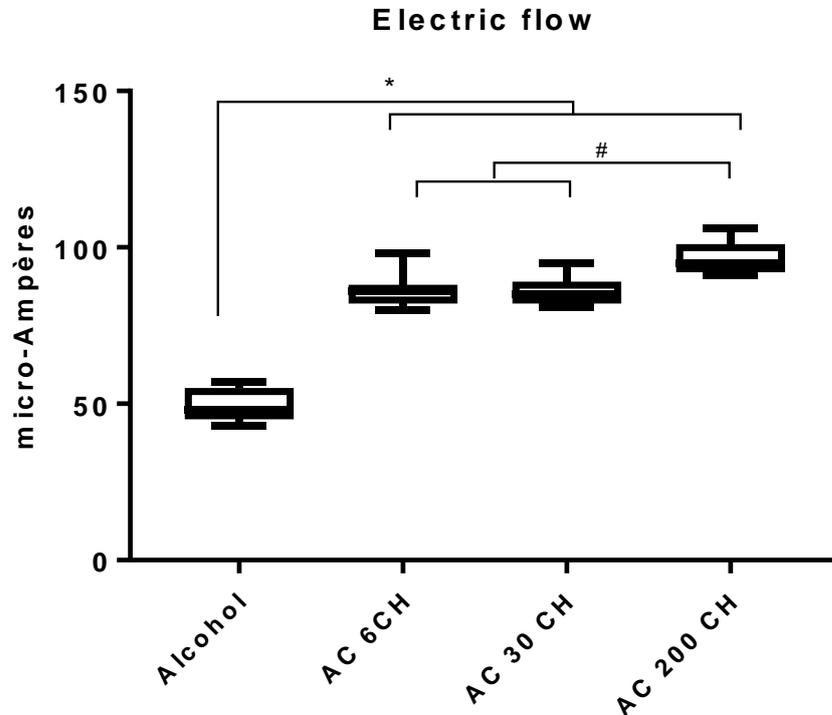
A intensidade de corrente elétrica (condutividade) do álcool 30% (veículo) mostrou-se significativamente menor que a das demais amostras (medicamentos), sendo  $p=0,0001$  (ANOVA de uma via com pós teste de Tukey). A condutividade do *Antimonium crudum* 200 cH foi estatisticamente maior que a dos demais medicamentos (*Antimonium crudum* 6 cH e *Antimonium crudum* 30 cH), sendo  $p = 0,007$  (ANOVA, Tuckey-Krammer).

Na **Tabela 2** seguem as leituras de condutividade encontradas para cada sistema de potências.

**Tabela 2.** Fluxo de corrente elétrica no líquido em microampères ( $\mu\text{A}$ ). Medida a partir do veículo (álcool de cereais 30%) e *Antimonium crudum* nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH. <sup>##</sup> p = 0,0001 em relação às demais amostras; <sup>#</sup> p = 0,007 em relação ao *Antimonium crudum* 6 cH (AC 6 cH) e *Antimonium crudum* 30 cH (AC 30 cH) (ANOVA, Tuckey-Krammer). A última coluna representa o controle ambiental.

	<b>Álcool cereais 30%</b>	<b>AC 6 cH</b>	<b>AC 30 cH</b>	<b>AC 200 cH</b>	<b>°C / Umid %</b>
	43	86	88	92	26,3 / 81
	48	84	82	106	26,6 / 80
	46	86	82	92	26,4 / 75
	45	80	81	91	26,4 / 70
	55	82	89	101	26,5 / 68
	53	98	95	101	26,5 / 64
	57	88	85	95	26,7 / 64
<b>Média</b>	<b>49##</b>	<b>86</b>	<b>86</b>	<b>96 #</b>	
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,050</b>	<b>0,053</b>	<b>0,046</b>	<b>0,053</b>	

Na **Figura 7** as diferenças entre as condutividades estão representadas em box-plot.



**Figura 7.** Fluxo de corrente elétrica nos medicamentos ( $\mu\text{A}$ ). Medida pela imersão de eletrodos positivo e negativo acoplados a microamperímetro (Ryodoraku®) nas amostras de medicamentos (N=9).

### 4.3 Análise da polaridade por corantes solvatocrômicos e espectroscopia de luz visível

Os dados iniciais mostraram o pico de leitura de cada corante já descontados do espectro obtido pelo álcool puro (linha-base), como apresentados a seguir:

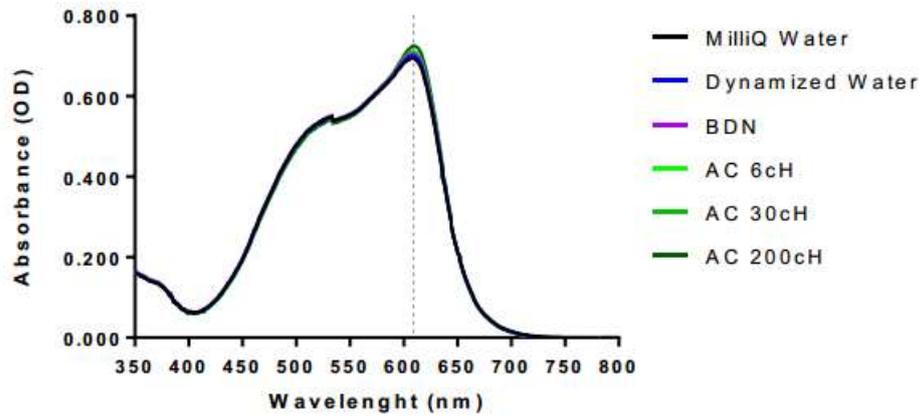
**Análise ET 33:** pico de leitura em 470 nm - absorvância = 0,684 (medida feita às 16:00h, 24°C, 45% umidade).

**Análise BDN:** pico de leitura em 609 nm - absorvância = 0,705 (medida feita às 15:20h, 24,1°C, 41% umidade).

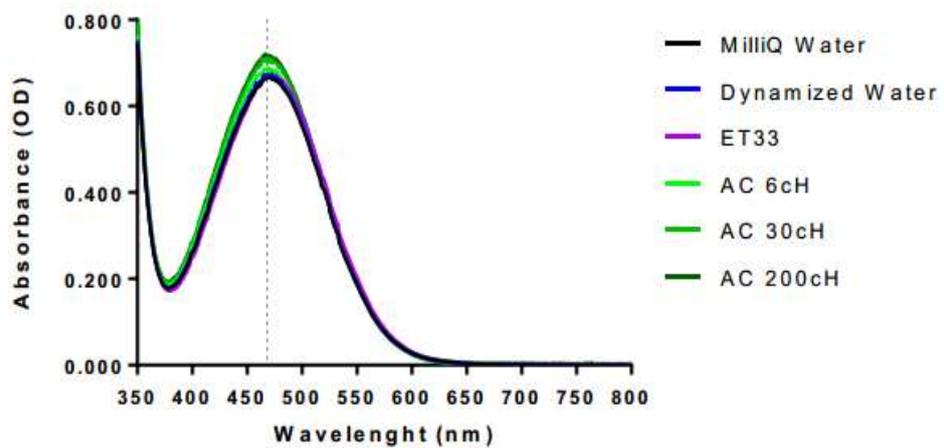
Na sequência, seguem os gráficos do espectro de absorvância dos corantes

em contato com os diferentes medicamentos e veículos, bem como a amplificação dos picos de absorbância (**Figuras 8 e 9**).

### BDN (A)

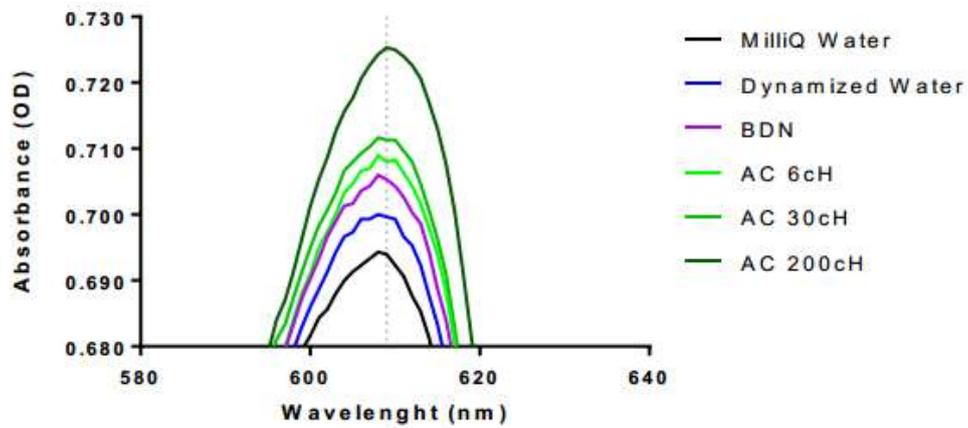


### ET33 (B)

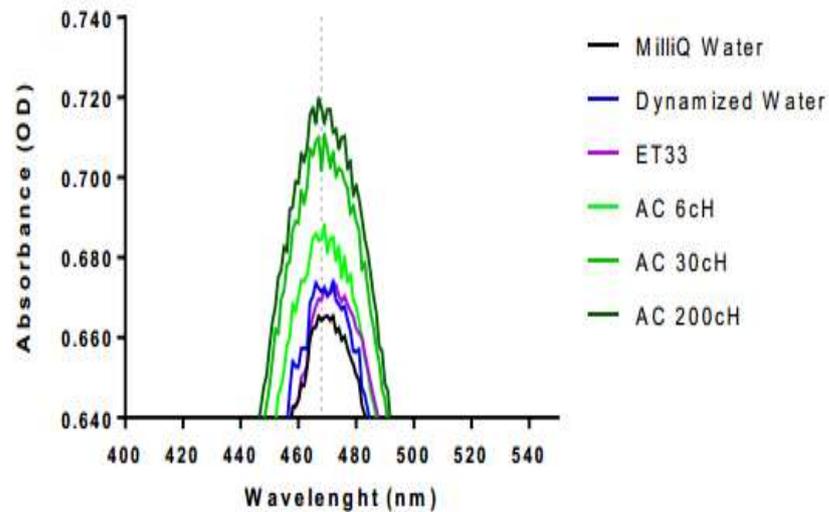


**Figura 8.** Varredura das absorbâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras, diluídas em **BDN (A)** ou em **ET33 (B)** medidas em espectrofotômetro.

## BDN (A)



## ET 33 (B)

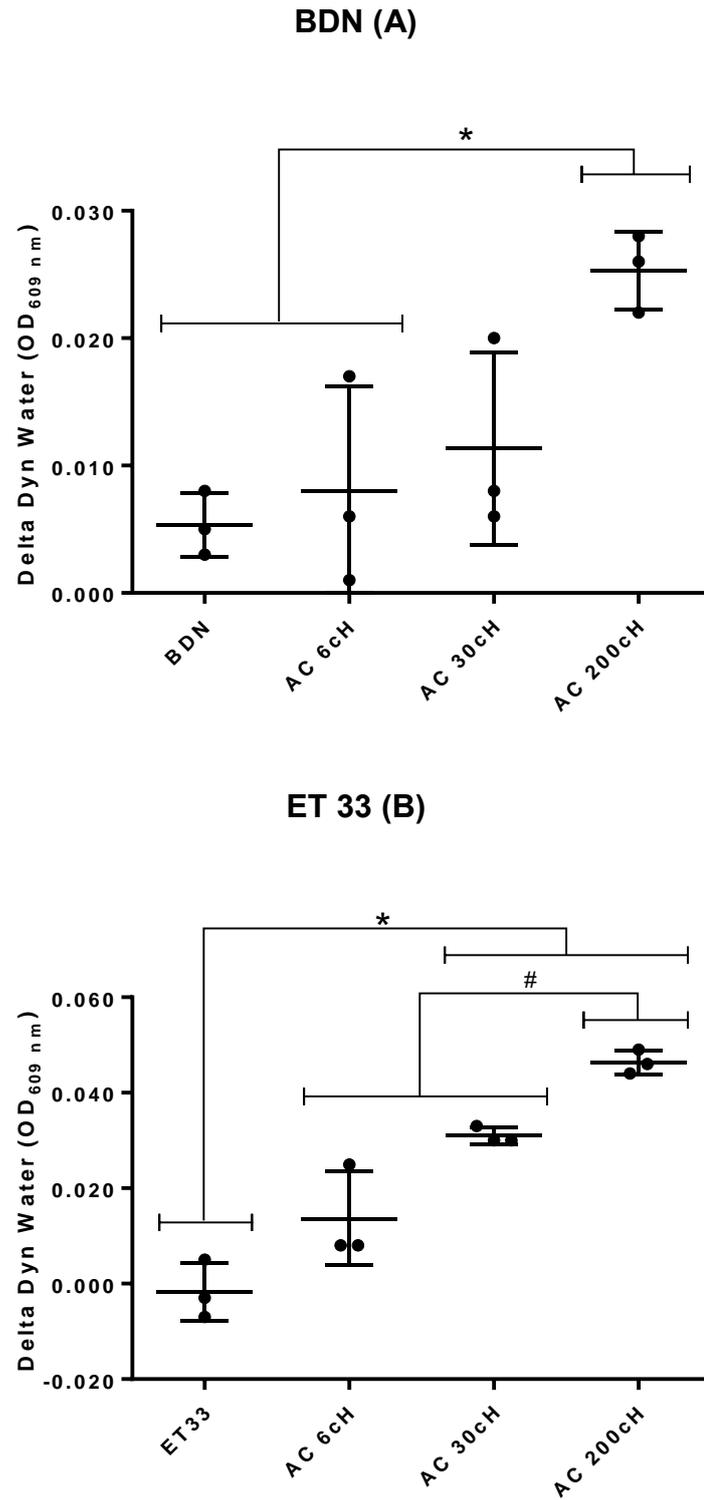


**Figura 9.** Pico amplificado das absorvâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras diluídas em **BDN (A)** ou em **ET33 (B)** medidas em espectrofotômetro.

Em ambos os casos, tanto utilizando o corante BDN quanto o ET33, observa-se que há uma variação progressiva e linear em relação às potências homeopáticas.

Assim, o deslocamento mais significativo do pico de absorvância em relação aos controles (corante puro, água pura e água pura dinamizada) foi obtido com *Antimonium crudum* 200 cH, seguido de *Antimonium crudum* 30 cH e *Antimonium crudum* 6 cH.

A análise estatística mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ) entre a potência 200 cH e os controles, na espectroscopia do corante BDN, bem como diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ) entre *Antimonium crudum* 30 cH e 200 cH e os controles, na espectroscopia do corante ET33 (**Figura 10**).



**Figura 10.** Pico de absorvâncias obtidas em espectro de luz UV visível (entre 350 e 800 nm). Nas diferentes amostras diluídas em **BDN (A)** ou em **ET33 (B)** e suas variações em função da presença de diferentes potências de *Antimonium crudum* ou de seus controles. \*ANOVA, Tukey,  $F(5, 12) = 8,128$ ;  $p=0,001$ ,  $\eta^2 = 0,772$  para BDN e  $F(3, 4.01) = 49,019$ ;  $p=0,001$ ,  $\eta^2 = 0,932$  para ET 33.

## 5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos na análise físico-química do *Antimonium crudum* em diferentes potências homeopáticas mostram aspectos importantes possivelmente associados às atividades biológicas específicas e inespecíficas deste medicamento. Tais dados corroboram os dados descritos por Cartwright (2016) e ainda são compatíveis com os efeitos biológicos encontrados anteriormente pelo nosso grupo, uma vez que somente as potências 30 cH e 200 cH apresentaram mudanças específicas na síntese de quimiocinas (MCP-1) e fatores de crescimento (VEGF) por macrófagos infectados com *L. amazonensis in vitro* (Santana *et al.*, 2017). A potência 6 cH não induziu alterações na absorbância de ambos os corantes, nem tampouco alterações biológicas.

A análise morfológica de amostras de AC no microscópio eletrônico de varredura revelou que o tamanho das micropartículas era menor nas amostras de água e *Antimonium crudum* 6 cH, sendo a maioria em forma de meia-lua. No entanto, curiosamente, o *Antimonium crudum* 30 cH apresentou aglomerados arredondados, maiores em tamanho, mas menos numerosos. Da mesma forma, o *Antimonium crudum* 200 cH apresentou aglomerados muito maiores e mais escassos, sugerindo que as micropartículas possam ser mantidas entre as diluições seriadas e ainda sofrerem processo de nucleação, sendo que as partículas transferidas agiriam como núcleo e as partículas menores presentes como contaminantes do veículo seriam aderidas às primeiras, a cada diluição. Esse conceito de nucleação está em sintonia com alguns artigos publicados recentemente (Demangeat, 2015; Chikramane *et al.*, 2017).

As partículas contaminantes suspensas em água pura mostraram a presença de Pb, Zn, Ca, Na, Au, Hg, Nb e Si, sendo todos em porcentagem menor que 20% por partícula, portanto, provavelmente não relacionados a nenhum efeito biológico específico. O fósforo foi identificado apenas em AC 30 cH (6.51%) e AC 200 cH (13.56%), mas também em concentração menor que outros elementos. Nenhuma partícula analisada a partir das preparações homeopáticas apresentou a presença de antimônio, o que contradiz a hipótese de atividade nano-farmacológica defendida por alguns autores (Bell *et al.*, 2015; Chikramane *et al.*, 2010, 2017; Khuda-Bukhsh, 2017).

Os dados obtidos no presente estudo, portanto, apontam para o fato de que talvez o tamanho das partículas em suspensão seja mais relevante para a atividade dos medicamentos homeopáticos do que a sua natureza química, o que sugere certa inespecificidade em uma possível ação biológica das mesmas. De fato essas observações não forneceram nenhuma evidência de relação com a atividade anti-inflamatória do *Antimonium crudum* 30 cH em camundongos portadores de leishmaniose cutânea (Rodrigues de Santana *et al.*, 2014), nem tampouco com a produção de MCP-1 *in vitro* (Rodrigues de Santana *et al.*, 2017). Da mesma forma, o aumento do pico de fagocitose observado em macrófagos após 48 horas de cocultura com *L. amazonensis* e tratamento com *Antimonium crudum* 200 cH poderia estar parcialmente relacionado ao tamanho das micropartículas encontradas em suspensão, de maneira que, ao fagocitar as partículas, os macrófagos fagocitariam acidentalmente um número maior de parasitas. Essa hipótese foi corroborada em um experimento desenvolvido recentemente pelo nosso grupo (Palombo *et al.*, 2017). No entanto, os efeitos específicos, relacionados com a produção de mediadores da inflamação, como a produção de MCP-1 e VEGF, não parecem depender do tamanho nem do conteúdo das micropartículas, por falta de correlação entre dados físico-químicos e biológicos. Não se pode descartar, contudo, que as alterações dos perfis dielétricos das diluições homeopáticas possam determinar, em alguma medida, a morfologia das partículas agregadas. Mas ainda faltam estudos a esse respeito.

Para a análise da condutividade, obedecemos ao mesmo protocolo de diluição utilizado nos experimentos biológicos, ou seja, na última elevação de potência utilizou-se como solvente apenas a água pura, previamente esterilizada e analisada quanto às partículas presentes. O álcool de cereais diluído a 30 % apresentou metade da condutância dos medicamentos, preparados no mesmo álcool e na mesma concentração. A polaridade dos solventes poderia interferir na condutividade encontrada, o que justificaria a diferença observada entre as potências estudadas. Por outro lado, a medida da condutividade pode ser modificada por diversos fatores presentes em uma diluição, tornando este método como um meio de triagem rápido para os estudos dos medicamentos homeopáticos sem, contudo, apresentar parâmetros específicos para a compreensão dos seus mecanismos.

Todos os sistemas líquidos apresentam um dinamismo característico entre a posição das moléculas e ao mesmo tempo precisam manter um equilíbrio com as demais moléculas livres no solvente (Dougherty, 1998), sendo assim, dado que todos os frascos apresentavam a mesma concentração de álcool, entende-se que as mudanças de condutividade podem estar associadas a fatores que vão além da polaridade dos solventes em si.

São variáveis provavelmente associadas a tais variações:

a) Presença de micropartículas metálicas em suspensão nos medicamentos (encontrados na microscopia eletrônica), pois é sabido que a presença de alguns íons pode alterar as propriedades do solvente utilizado nos sistemas homeopáticos.

b) O número de sucussões (Betti *et al.*, 2017) e a formação de nanobolhas em maior ou menor quantidade, pois também podem modificar a condutância. As nanobolhas podem ser um fator de desestruturação dos clusters de água, interferindo na oscilação eletromagnética (Thomas, 2015) e dificultando a impressão química que o medicamento homeopático promoveria no solvente. Talvez mudanças na formação dos clusters da água aconteçam em função das agitações do líquido, de forma que um padrão específico se formaria em 200cH. Neste caso, acredita-se que quanto mais “estável” a interação eletromagnética (Schulte e Endler, 2015) mais específica seria a ação esperada.

c) O tamanho e o formato das macromoléculas podem alterar a frequência de ressonância (Mahata, 2013), assim como também o método de preparo é capaz de mudar as características físico-químicas do sistema, mudando o padrão de agregação entre as moléculas (Schulte, 2015) e contribuindo para a diferença de ação entre as potências de um mesmo medicamento.

Apesar de constatarmos a existência de inúmeros fatores interferentes, a proporcionalidade da condutividade em relação à potência sugere haver alguma relação direta com os efeitos biológicos do *Antimonium crudum*, talvez como um “marcador eletrônico”. Contudo, dado que vários são os fatores capazes de interferir nas medidas, é necessário a adição de outros métodos para que tal correlação seja feita com mais segurança. Os dados obtidos da espectrofotometria revelam que houve aumento nos picos de absorbância em comprimentos de onda determinados

para cada corante, quando comparamos os medicamentos nas potências 30 cH e 200 cH e os controles (água pura e água dinamizada). Este aumento da absorvância é condizente com o aumento da polaridade que as preparações de *Antimonium crudum* causaram nos respectivos corantes, demonstrando haver interação eletrônica potência-dependente. Os dados obtidos na condutância corroboram a hipótese de interação eletrônica.

Curiosamente, as diferenças estatisticamente significantes de absorvância em ambos os corantes só foram identificadas nas potências que apresentaram efeitos biológicos específicos (30 cH e 200 cH). A potência 6 cH mostrou padrão semelhante ao da água pura (dinamizada ou não) e ao do corante puro. Da mesma forma, essa potência não revelou nenhum efeito biológico detectável em estudos prévios (Santana *et al.*, 2016).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação global dos resultados sugere a existência de um marcador eletrônico associado aos efeitos biológicos de altas diluições de *Antimonium crudum*, o qual se torna evidente sobretudo pelo método da espectrofotometria de corantes polares, reforçando a necessidade de mais estudos sistemáticos sobre tais variáveis.

## REFERÊNCIAS

- 1- ANVISA. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**, 3a. ed. 2011. [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf)
- 2- Bell IR, Muralidharan S, Schwartz GE. Nanoparticle Characterization of Traditional Homeopathically-Manufactured *Gelsemium sempervirens* Medicines and Placebo Controls. **J Nanomedicine Biotherapeutic. Discov** (2015) 5: 136. doi:10.4172/2155-983X.1000136
- 3- Bellavite P, Marzotto M, Olioso D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. **Homeopathy**. 2014 Jan;103(1):4-21. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.003. Review.
- 4- Bellavite P, Marzotto M, Olioso D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**. 2014 Jan;103(1):22-43. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.002. Review.
- 5- Betti L, Trebbi G, Kokornaczyk MO, Nani D, Peruzzi M, Dinelli G, Bellavite P, Brizzi M. Number of succussion strokes affects effectiveness of ultra-high-diluted arsenic on *in vitro* wheat germination and polycrystalline structures obtained by droplet evaporation method. **Homeopathy**. 2017 Feb;106(1):47-54. doi: 10.1016/j.homp.2016.12.001.
- 6- Bonamin LV, Lagache A, Bastide M. Research on Ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: The follow up. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images, Contributions and Contradictions about High Dilution Research**. Dordrecht. Springer, 2008. pp 3-25.
- 7- Cajueiro APB, Goma EP, Dos Santos HAM, Almeida Rodrigues I, Toma HK, Araújo SM, Bonamin LV, Gomes NBN, Castelo-Branco MTL, de Souza Dias EP, Dos Santos Pyrrho A, Holandino C. Homeopathic medicines cause Th1 predominance and induce spleen and megakaryocytes changes in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Cytokine**. 2017 Jul;95:97-101. doi: 10.1016/j.cyto.2017.02.010.
- 8- Cartwright SJ. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. **Homeopathy**. 2016 Feb;105(1):55-65. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.002.

- 9- Cartwright SJ. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchson. Part 1: pH studies. **Homeopathy**. 2017 Feb;106(1):37-46. doi: 10.1016/j.homp.2017.01.001.
- 10- Chikramane PS, Suresh AK, Bellare JR, Kane SG. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. **Homeopathy**. 2010 Oct;99(4):231-42. doi: 10.1016/j.homp.2010.05.006.
- 11- Chikramane PS, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Metal nanoparticle induced hormetic activation: a novel mechanism of homeopathic medicines. **Homeopathy**. 2017 Aug;106(3):135-144. doi: 10.1016/j.homp.2017.06.002. Epub 2017 Jul 21.
- 12- Dalboni LC *et al.* **Preparações homeopáticas dinamizadas em frasco de vidro e plástico e sua influência na fagocitose *in vitro***. [Dissertação] de Mestrado. Universidade Paulista. São Paulo; 2016.
- 13- Demangeat JL. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. **Homeopathy**. 2015 Apr;104(2):101-15. doi: 10.1016/j.homp.2015.02.001.
- 14- Dougherty, RC; Howard, LN. **J. Chem Phys**, v109, p 7370-7393, 1998.
- 15- Elia V, Ausanio G, Gentile F, Germano R, Napoli E, Niccoli M. Experimental evidence of stable water nanostructures in extremely dilute solutions, at standard pressure and temperature. **Homeopathy**. 2014 Jan;103(1):44-50. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.004.
- 16- Fedorets, A.A; Frenkel, M.; Shulzinger, E.; Dombrovsky, L.A.; Bormashenko, E.; Nosonovsky, M. Self-assembled levitating clusters of water droplets: pattern-formation and stability. **Nature Scientific Reports**. 2017, 7:1888. Doi:10.1038/s41598-017-02166-5.
- 17- Khuda-Bukhsh A. Na overview of research at University of Kalyani in exploring some basic issue of Homeopathy. **Indian J Res Homoeopathy** 2017; 11:147-57.
- 18- Mahata CR. Dielectric dispersion studies of some potentised homeopathic medicines reveal structure vehicle. **Homeopathy**, v 102, p 262-267, 2013.

- 19- Molski M. Quasi-quantum phenomena: the key to understanding homeopathy. **Homeopathy**. 2010 Apr; 99(2):104-12. doi: 10.1016/j.homp.2009.11.009.
- 20- Nascimento KF, de Santana FR, da Costa CRV, Kaplum V, Volpato H, Nakamura CV, Bonamin LV, de Freitas Buchi D. M1 homeopathic complex trigger effective responses against *Leishmania (L) amazonensis* *in vivo* and *in vitro*. **Cytokine**. 2017 Jul 21; 99:80-90. doi: 10.1016/j.cyto.2017.07.001.
- 21- Palombo RR, Schultz C, Pinto SAG, Dalboni LC, Santana FR, Correia MS, Dutra-Correa M, Bonamin LV. Searching the mechanisms involved in *Antimonium crudum* action on macrophage-leishmania interaction *in vitro*. **Proceedings of the XXXI GIRI meeting**. Krakov, Poland. *In press*.
- 22- Santana FR, de Paula Coelho C, Cardoso TN, Perez Hurtado EC, Roberti Benites N, Dalastra Laurenti M, Villano Bonamin L. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimonium crudum* 30cH. **Homeopathy**. 2014 Oct; 103(4):264-74. doi: 10.1016/j.homp.2014.08.006.
- 23- Santana FR, Dalboni LC, Fialho K, Konno FT, Casarin R, Buchi DF, Laurenti MD, Benites NR, Bonamin LV. Effects of *Antimomium crudum* 30cH and 200cH on the macrophage - *Leishmania amazonensis* (L) relation *in vitro*. **Proceedings of the XXX GIRI meeting**, Amsterdam, Deutschland, September 2016. <https://goo.gl/aDpPLW>
- 24- Santana FR, Dalboni LC, Nascimento KF, Konno FT, Alvares-Saraiva AM, Correia MS, Bomfim MD, Casarin RC, Perez EC, Lallo MA, Peres GB, Laurenti MD, Benites NR, Buchi DF, Bonamin LV. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - *Leishmania (L.) amazonensis* interaction *in vitro*. **Cytokine**. 2017 Apr; 92:33-47. doi: 10.1016/j.cyto.2017.01.004.
- 25- Schulte J. Observations on entanglement, non-locality and ultra-high dilutions. **Homeopathy**. 2015 Oct;104(4):316-21. doi: 10.1016/j.homp.2015.06.010. Epub 2015 Aug 7.
- 26- Schulte J, Endler PC. Update on preliminary elements of a theory of ultra-high dilutions. **Homeopathy**. 2015 Oct;104(4):337-42. doi: 10.1016/j.homp.2015.09.010.

- 27- Thomas Y. From high dilutions to digital biology: the physical nature of the biological signal. **Homeopathy**, v 104, p 295-300, 2015.
- 28- Verdel N, Jerman I, Krasovec R, Bukovec P, Zupancic M. Possible time-dependent effect of ions and hydrophilic surfaces on the electrical conductivity of aqueous solutions. **Int J Mol Sci**. 2012;13(4):4048-68. doi: 10.3390/ijms13044048.