

UNIVERSIDADE PAULISTA

PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DINAMIZADAS EM
FRASCO DE VIDRO E PLÁSTICO E SUA INFLUÊNCIA
NA FAGOCITOSE *IN VITRO***

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.

LUCIANE COSTA DALBONI

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE PAULISTA

PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DINAMIZADAS EM
FRASCO DE VIDRO E PLÁSTICO E SUA INFLUÊNCIA
NA FAGOCITOSE *IN VITRO***

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.

LUCIANE COSTA DALBONI

SÃO PAULO

2016

Dalboni, Luciane Costa.

Preparações homeopáticas dinamizadas em frasco de vidro e plástico e sua influência na fagocitose *in vitro* / Luciane Costa Dalboni. - 2016.

49 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Modelos experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Leoni Villano Bonamin.

Co-orientadora: Dr.^a Fabiana Rodrigues Santana.

1. Homeopatia. 2. Macrófagos. 3. Farmacocinética. 4. *Arsenicum álbum*. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Santana, Fabiana Rodrigues (co-orientadora) III. Título.

LUCIANE COSTA DALBONI

**PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DINAMIZADAS EM
FRASCO DE VIDRO E PLÁSTICO E SUA INFLUÊNCIA
NA FAGOCITOSE *IN VITRO***

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.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista-UNIP

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Perez Hurtado

Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Amarilys de Toledo Cesar

Farmácia Homeopática -HN CRISTIANO

AGRADECIMENTOS

À Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas (ABFH) por todo o financiamento deste projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) pela bolsa de estudo.

À Prof.^a Dr.^a Amarilys de Toledo Cesar, da Farmácia Homeopática HN Cristiano, por ceder um espaço em seu laboratório para a realização dos medicamentos e todo suporte de sua equipe.

À Prof.^a Dr.^a Carla Holandino (UFRJ) por produzir e conceder a matriz do medicamento e à Prof.^a Dr.^a Silvia Waisse (PUC) por ajudar na construção do projeto.

À professora da Pós-graduação da UNIP, Dr.^a Elizabeth Perez Hurtado, pelo aprendizado em imunologia; à Prof.^a Dr.^a Cidéli Coelho da UNISA, pelo apoio na execução do projeto e ao Prof. Paulo Ricardo D'Armellina pela ajuda com as referências bibliográficas.

À Dr.^a Fabiana Toshie de Camargo Konno, responsável técnica do laboratório de Biologia Molecular da UNIP, pela paciência, ensinamento e disposição de sempre ajudar.

À amiga e aluna da UNIP, Dr.^a Fabiana Rodrigues Santana, pela paciência em ensinar as técnicas de cultura celular e pela co-orientação prestada.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular da UNIP, pelo apoio técnico e amizade: Suzana Bezerra, Cleide Santana e Osvaldo Martins Cordeiro.

À Prof.^a Dr.^a Maristela D Corrêa, professora do programa de pós-graduação em Odontologia e à Michelle Sanchez de Aguiar, responsável técnica do laboratório de Odontologia do Centro de pesquisa da UNIP, pela dosagem de citocinas e microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus amigos alunos da UNIP, Juan Justino de Araújo Neves, Renata Iovine, Eliane Chiurco, Carolina Schultz, Thayná Cardoso, pela amizade e apoio sempre.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin da UNIP, por todos os ensinamentos prestados e pela oportunidade de aprender muito sobre homeopatia, sempre com muita dedicação.

Artigo científico a ser submetido à revista *Homeopathy*

**PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DINAMIZADAS EM FRASCO DE VIDRO E
PLÁSTICO E SUA INFLUÊNCIA NA FAGOCITOSE *IN VITRO***

Luciane Costa Dalboni¹, Fabiana R Santana¹, Carolina Schultz¹, Fabiana Toshie Konno¹, Thayná N Cardoso¹, Silvia Waisse², Amarilys T César³, Carla Holandino⁴, Cidéli P Coelho¹⁻⁵, Michelle Sanchez C Aguiar¹, Maristela D Corrêa¹, Leoni Villano Bonamin¹

1. Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), São Paulo
2. Pontifícia Universidade Católica (PUC), São Paulo
3. Farmácia Homeopática HN CRISTIANO, São Paulo
4. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro
5. Universidade de Santo Amaro (UNISA), São Paulo

RESUMO

Introdução: De acordo com a chamada “hipótese da sílica”, a informação dos materiais originais para o preparo de medicamentos homeopáticos seria transferida por epitaxia sobre nanopartículas (NP) de sílica, em função do processo de agitação e diluição, nas potências subsequentes. **Objetivo:** Comparar os efeitos biológicos de preparações homeopáticas dinamizadas em frasco de vidro e plástico para verificar o papel da sílica no mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos. **Métodos:** *Arsenicum album* nas diluições 30K, 6CH e 200CH, dinamizado em frascos de vidro e plástico, foi utilizado para tratar macrófagos RAW 264.7 mantidos em co-cultura com leveduras. A morfologia celular foi analisada por microscopia de luz e microscopia de fluorescência. A atividade oxidativa foi analisada pela dosagem de metabólitos do óxido nítrico (método de Griess) e 13 citocinas foram dosadas pelo método Luminex-Magpix. A composição das micropartículas presentes nos medicamentos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura associada à espectroscopia por dispersão de energia de Raio X. A condutância dos medicamentos também foi analisada. **Resultados:** Somente os medicamentos dinamizados em frascos de vidro apresentaram sílica na composição das micropartículas em suspensão, as quais mostraram composição totalmente randômica e sem relação com os efeitos biológicos. O tratamento com *Arsenicum album* 30K dinamizado em frasco de plástico apresentou aumento no *spreading* fagocitário em relação aos controles; porém, sem alterações no índice fagocítico e na dosagem de óxido nítrico. O *Arsenicum album* 6CH dinamizado em plástico induziu aumento de citocinas pró-inflamatórias sem alteração morfológica das células. O medicamento *Arsenicum album* 200CH, também dinamizado em frasco plástico, induziu aumento no *spreading*, no índice fagocítico e na produção de óxido nítrico. **Discussão e conclusão:** Efeitos inespecíficos do plástico sobre a atividade dos macrófagos podem estar relacionados à presença aleatória de resíduos orgânicos desprendidos durante a desinfecção dos frascos e a sucção; contudo, a participação da sílica parece improvável. O MEV+EDX e condutância parecem ser ferramentas úteis para o controle de qualidade de preparações homeopáticas.

Palavras chave: homeopatia; sílica; macrófagos; farmacotécnica; *Arsenicum album*.

ABSTRACT

Introduction: According to the so-called "silica hypothesis", the information of the original materials for the preparation of homeopathic drugs would be transferred by epitaxy on silica nanoparticles (NP) due to dilution and stirring process. **Objective:** Compare the biological effects of homeopathic preparations made in glass and plastic bottles to verify the role of silica in the mechanism of action of homeopathic medicines. **Methods:** *Arsenicum album* 30K, 6CH and 200cH, prepared in glass and plastic bottles, has been used to treat RAW 264.7 macrophages maintained in co-culture with yeasts. Cell morphology was analyzed by light and fluorescence microscopy. The oxidative activity was assayed by measurement of nitric oxide metabolites (Griess method) and 13 cytokines were measured by Luminex-Magpix method. The composition of the microparticles present in the drugs was analyzed by scanning electron microscopy associated with X ray energy dispersive spectroscopy. The drug conductance was also analyzed. **Results:** Only medicines dynamized in glass bottles presented silica in the composition of suspended microparticles, which showed random composition unrelated to the biological effects. Treatment with *Arsenicum album* 30K prepared in plastic bottle showed increase in phagocytic spreading compared to controls, but without changes in the phagocytic index and nitric oxide dosage. The *Arsenicum album* 6CH prepared in plastic bottle induced increase in pro-inflammatory cytokines without morphological changes in the cells. On the other hand, *Arsenicum album* 200cH also prepared in plastic bottle induced increase in spreading, phagocytic index and nitric oxide production. **Discussion and conclusion:** unspecific effects of plastic on the macrophage activity might be related to the random presence of organic waste given off during the disinfection process of the bottles and succussion, however, the participation of silica seems unlikely. The SEM + EDX and the conductance appear to be useful tools for quality control of homeopathic preparations.

Keywords: homeopathy; silica; macrophages; pharmacotechniques; *Arsenicum album*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	10
2 OBJETIVO	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Ética.....	15
3.2 Preparação dos medicamentos.....	15
3.3 Cultura de macrófagos com leveduras e tratamento.....	16
3.4 Histomorfometria	16
3.5 Alaranjado de acridina	16
3.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	17
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX)	17
3.8 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas	19
3.9 Acuspointer Ryodoraku	19
3.10 Análise Estatística	19
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO	49

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Hipócrates (460-350 A.C) foi quem descreveu a lei dos semelhantes através do aforismo “Simillia similibus curantur”, ou seja, “O semelhante cura o semelhante” [1]. A homeopatia consiste em administrar, ao doente portador de determinados sintomas, doses mínimas de uma droga capaz de provocar, em indivíduos sadios e sensíveis, sintomas semelhantes aos apresentados pelo doente. Foi Christian Friedrich Samuel Hahnemann, um médico alemão conhecido como o criador da homeopatia, o pioneiro da experimentação no homem são, podendo considerar-se então o pai da homeopatia por sistematizar tal método a partir da lei de semelhança. Em 1806, Hahnemann publicou o trabalho “As indicações sobre o uso homeopático dos medicamentos”, sendo pela primeira vez adotada a palavra homeopatia [2].

A homeopatia foi introduzida no Brasil com a chegada do francês e também negociante de comércio Benoit Jules Mure em 1840, e as primeiras evidências de atividade homeopática no Brasil se deram no século XIX, por contribuição do médico suíço Frederico Jahn em 1836 [3]. Atualmente, pesquisas de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas com tratamento alternativo junto com o tratamento convencional só aumentam, visando a melhores resultados e custo benefício, já que os medicamentos homeopáticos são retirados diretamente da natureza [4].

Recentemente, alguns autores identificaram nanopartículas (NP) dos materiais originais em altas diluições de medicamentos homeopáticos preparadas acima do número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$)[5,6]. Os medicamentos homeopáticos preparados em recipientes de vidro contêm NPs de sílica [5,6,7,8,9,10], as quais são desprendidas pelo processo de agitação e podem representar um componente fundamental para o mecanismo de ação desses medicamentos [6,7,8,9,11,12]. A hipótese microestrutural dos medicamentos homeopáticos consiste em identificar nanoestruturas revestidas de silicato dispersos no solvente [13].

A nanosílica pode formar estruturas tridimensionais estáveis, utilizando DNA, proteínas ou células vivas como moldes (crescimento epitaxial) [14,15,16,17,18,19, 20]. A epitaxia é um fenômeno de observação comum em

ciência e tecnologia dos materiais, especialmente na fabricação de semicondutores. Implica na transferência de informação estrutural sem transferência de matéria, na qual o material cristalino cresce na superfície de outro, imitando sua estrutura [21], por isso a nanosilica é muito utilizada, pois as partículas de sílica não apresentam efeitos genotóxicos *in vitro* ou *in vivo* [22].

A nanotecnologia utiliza sílica regularmente na montagem de nanoestruturas específicas baseadas em DNA, proteínas ou outros materiais como moldes epitáxicos estruturais [18, 23]. Na hipótese em questão, a nanosílica, se presente [7], serviria como amplificador inespecífico [24, 25] ou como veículo para alguma informação específica, de natureza estrutural ou eletromagnética. Isto é, as NPs de sílica agiriam como transportadoras de informação do material original e seriam identificadas e interpretadas por sistemas biológicos [26]. Assim sendo, a interação e adsorção das NPs do material original em lactose e/ou sílica nas potências baixas, como, por exemplo, a partir de uma trituração 1CH [27], criariam “nanosementes” específicas, as quais seriam usadas na produção das potências subsequentes [6, 28, 29]. As NPs vêm sendo utilizadas intensamente na medicina e na agricultura: nanopartículas de prata (AgNs) carregadas de medicamentos naturais podem ser muito eficazes, propiciando rapidez e menor custo de preparação [30]. As nanopartículas também podem estar associadas a alterações de condutibilidade, como demonstrado no medicamento homeopático *Ferrum metallicum* [31].

No estudo de Boiron *et al* [32], o uso de vidros parafinados reduziu o efeito das altas diluições (HDs) em comparação com as dinamizações preparadas em vidro apenas. Contudo, não houve diferenças visivelmente evidentes entre soluções equivalentes (7CH e 15CH) preparadas com ou sem agitação. No único estudo em que se compara a concentração de contaminantes (elementos químicos) em função do material dos recipientes, tempo de armazenagem e dinamização, Witt e colaboradores [12] observaram que: 1) houve ausência total de silício em recipientes de polipropileno; 2) a concentração de contaminantes aumentou marcadamente na passagem de água bidestilada armazenada em polipropileno para recipientes de vidro, de silício, lítio, e sódio, em particular; 3) a maior diferença na concentração de contaminantes ocorreu na passagem da tintura-mãe à primeira diluição centesimal (1 CH), por meio do método

Hahnemaniano (frascos múltiplos) reforçando a hipótese de epitaxia, sendo que os seguintes passos de dinamização, até a 30 CH, não aumentaram a concentração dos contaminantes; e 4) a maior diferença na concentração deu-se após as primeiras horas de armazenagem (6 vs. 30 horas; sem diferença entre 30 e 54 horas). Os autores também chamam a atenção para o trabalho de Milgrom *et al* [33], afirmando que a substituição de vidro borossilicato por vidro sodo-cálcico resultou no desaparecimento dos efeitos sobre o tempo de relaxação spin-spin em ressonância magnética nuclear sem, contudo, concluir sobre possíveis mudanças nos efeitos biológicos desses medicamentos. No entanto, o vidro sodo-cálcico também é feito à base de sílica, portanto qualquer alteração nos efeitos não pode ser atribuída ao tipo de recipiente.

No presente estudo comparamos os efeitos biológicos com co-culturas de macrófagos da linhagem RAW e da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), encontrada no fermento e também utilizada em pesquisas básicas em homeopatia [34]. O modelo *in vitro* proposto teve como objetivo comparar os efeitos de preparações homeopáticas de *Arsenicum album* 30 K, 6CH e 200CH, dinamizadas em frascos de vidro e plástico, para melhor compreensão do papel da sílica nos efeitos biológicos desse medicamento, partindo-se da hipótese de que os mecanismos de ação ocorreriam no nível molecular [35, 36].

Os macrófagos são células da linhagem mielóide do sistema imunológico (SI), sendo especializadas em fagocitose contra patógenos e produção de citocinas [37]. São essenciais para o desenvolvimento dos tecidos, homeostase e inflamação. Uma característica marcante dessas células é sua capacidade de resposta de acordo com os estímulos ambientais [38]. Sendo assim, dados recentes sugerem que os macrófagos têm funções específicas e que fatores epigenéticos podem afetar sua função normal e evoluir para aparecimento de diversas doenças. Dentro de cada tecido, o macrófago funciona com heterogeneidade e sua ação depende da sua localização no tecido [39, 40, 41]. Sendo os macrófagos células muito sensíveis a pequenos estímulos, os mesmos tornam-se um sensor biológico de excelência para pesquisas em homeopatia. Mas ainda há necessidade de mais estudos para esclarecer qual a exata influência do plástico nas preparações homeopáticas dinamizadas em frascos de plástico.

A literatura sobre medicamentos homeopáticos dinamizados em frascos de plástico ainda é escassa. O que mais se encontra na literatura com material de plástico são estudos que envolvem o consumo em alimentos embalados ou armazenados em plástico de polietileno, como a água mineral, em que se mostra a presença de disruptores endócrinos na sua composição, em concentrações não tóxicas. Tais compostos seriam liberados na água quando em altas temperaturas (40°C a 60°C), mas experimentalmente não apresentaram nenhuma atividade citotóxica ou endócrina [42, 43, 44].

Neste contexto, o presente trabalho comparou os efeitos de diluições homeopáticas de *Arsenicum album*, preparadas em recipientes de vidro e plástico, em modelo biológico *in vitro*, visando estabelecer se a presença de sílica é determinante na ação desses medicamentos. Os resultados são de extrema relevância para a compreensão do mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos, além de terem implicações práticas altamente significativas para a farmácia homeopática, pois dão base para se estabelecer em que medida a substituição de frascos de vidro por frascos de plástico na dinamização e estoque de matrizes dos medicamentos seria uma opção interessante e viável.

2 OBJETIVO

Comparar os efeitos biológicos de preparações homeopáticas dinamizadas em frascos de vidro e plástico utilizando co-culturas de macrófagos e leveduras *in vitro*, para verificar o papel da sílica no mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

Por se tratar de estudo 100% *in vitro*, utilizando células da linhagem RAW 264.7, a aprovação do comitê de ética da UNIP para uso de animais em pesquisa não foi necessária (ANEXO).

3.2 Preparação dos medicamentos

As matrizes dinamizadas foram preparadas no Laboratório HN Cristiano, São Paulo, sob a supervisão da Farmacêutica Amarilys Toledo Cesar, a partir da matriz de estoque 3CH em Lactose (UFRJ®), produzida na Farmácia Escola da UFRJ e cedida pela Prof^a. Dr^a. Carla Holandino. As diluições foram feitas em recipientes de vidro âmbar convencional (vidro tipo II) ou plástico PET (polipropileno R18/400, Apace®) para dispensação de medicamentos [45]. Os frascos de plástico foram desinfetados em microondas, recebendo 3 choques de 5 minutos em potência alta. Os frascos de vidro foram desinfetados em autoclave a 121°C, por 30 minutos. Todos os procedimentos seguiram as normativas descritas na Farmacopeia Homeopática Brasileira (3^a edição).

O método Korsakov (onde todas as diluições em sequência são feitas num mesmo frasco) foi aplicado de forma diferenciada, sendo que se partiu da matriz 3CH em lactose dissolvida em solução hidroalcoólica 20% e não a partir da 30CH, como descrito na Farmacopeia Homeopática Brasileira. Posteriormente, as diluições seguintes foram feitas em solução hidroalcoólica 70% até atingir a diluição 30K. Esta última passagem foi feita utilizando água pura estéril. As diluições centesimais seriadas 6CH e 200CH também foram feitas a partir da matriz 3CH em lactose e também seguiram as normativas da Farmacopeia Homeopática Brasileira.

Para as análises dos medicamentos na potência 200CH, uma variável adicional foi inserida: o medicamento preparado em vidro foi centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos, e a fase superficial do líquido foi recolhida separadamente para fins de comparação com o medicamento integral. O objetivo desse procedimento foi separar as partículas mais pesadas, contendo sílica, da fase líquida superficial.

Os frascos foram embalados em papel alumínio e suas etiquetas foram trocadas por um funcionário do laboratório não envolvido diretamente na experimentação. As etiquetas originais e os respectivos códigos foram mantidos em envelope lacrado durante todo o ensaio e o mesmo só foi aberto após o término da análise estatística. Assim, todo o procedimento experimental foi feito em cego.

3.3 Cultura de macrófagos com leveduras e tratamento

Os macrófagos RAW 264.7 foram descongelados, distribuídos em garrafas de cultura e adicionados ao meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino, 200U ml^{-1} penicilina, 100U ml^{-1} estreptomicina e $2.6\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de anfotericina. O plaqueamento foi feito em placas de 6 poços processadas em triplicatas, contendo 25×10^5 células por poço. Nenhuma lamínula foi inserida no poço para manter o microambiente celular livre de sílica. A levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) foi adicionada sobre as células aderidas no fundo do poço na proporção 1:10 (macrófago/levedura), ou seja, 25×10^6 leveduras por poço. O tratamento foi feito com os medicamentos *Arsenicum* 30K, *Arsenicum* 6CH, *Arsenicum* 200CH, *Arsenicum* 200CH centrifigado, todos preparados em água pura e filtrados em filtro Millipore® 22 μm , utilizando 20% do volume total do meio de cultura de cada poço. Após 24 horas, foi feito o reforço dos mesmos medicamentos a 1% do volume total. Após 48 horas, as células foram fixadas com metanol absoluto por 15 minutos e coradas pelo método Giemsa.

3.4 Histonormometria

As células fixadas e coradas no fundo de cada poço, após a secagem do fixador, foram examinadas em microscopia ótica. Foram feitas 10 fotos por campo, sendo contadas 200 células por poço, com a objetiva (100x), em imersão. A área média das células (ou *spreading*) medida em *pixels* e o número de microorganismos fagocitados foram contados em sistema automatizado, pelo software Metamorph® (Molecular Devices, Estados Unidos). O índice fagocítico foi calculado pela porcentagem de leveduras internalizadas em relação ao número de células fagocíticas por campo microscópico.

3.5 Alaranjado de acridina

Neste experimento, as células mantidas em co-cultura e tratadas por 48 horas foram incubadas em estufa de CO₂ com alaranjado de acridina (5 µg / ml) por 20 minutos. Após a incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS), as lamínulas foram colocadas sobre as células com uma gota de PBS, sendo as amostras examinadas a fresco em um microscópio de fluorescência (OLYMPUS-BX60, Japão) para observação da fagocitose em tempo real. As imagens foram capturadas por câmera digital (Eye-Câmera, DINO-EYE® - AM7023, China). A fluorescência verde aparece nas estruturas de ácido nucleico de cadeia dupla (DNA). A fluorescência vermelha/alaranjada aparece vinculada ao ácido nucleico de cadeia simples (RNA) ou a estruturas ácidas, como lisossomos e fagolisossomos. A análise qualitativa da morfologia celular foi feita por meio de fotomicrografias seriadas.

3.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

O sobrenadante colhido no ensaio de fagocitose foi congelado a -80°C, para posterior dosagem de nitrito (NO₂⁻) produzido pelos macrófagos em cultura. A dosagem foi feita por método colorimétrico em placas de 96 poços, em duplicata, sendo misturados, em cada poço, 100 µl do sobrenadante e 100 µl do reagente de Griess (NEED 0,1% e SULFANILAMIDA 1%). A curva foi feita a partir de solução mãe (140 mg de nitrito de sódio, SIGMA + 10 ml de água destilada). As placas foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro (ELISA) a 540 nm. Os resultados foram expressos em µg de NO para 10⁵ células, comparando-se a densidade ótica (DO) com a curva padrão de NO₂.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX)

A identificação das micropartículas em suspensão contidas nos medicamentos foi feita pelo método da micro-evaporação seguido de MEV + EDX, em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 6510®). Assim, os microtubos contendo amostras de cada medicamento selecionado foram centrifugados por 30 minutos a 5000 rpm, para sedimentação das micropartículas. Em seguida, sobre cada *stub* (plataforma), foram colocados 10 µL de cada amostra e o mesmo foi inserido no aparelho. Para garantir que as partículas analisadas fossem exclusivamente aquelas obtidas da centrifugação dos

medicamentos, cada *stub* foi previamente limpo com acetona 70% e mantido em uma placa de Petri fechada, dentro da capela. As gotas foram secas naturalmente sobre os *stubs*, em torno de 15 minutos. A MEV permite a análise estrutural e morfológica das partículas (**Figura 1**) e o EDX realiza a análise química superficial; dessa forma, é possível identificar os elementos químicos presentes em cada amostra. Os resultados do EDX são apresentados em forma de gráficos, nos quais os picos correspondentes a cada elemento químico são identificados. Ao final da análise, o programa apresenta tabelas com a porcentagem / átomos para cada elemento químico presente em cada amostra.

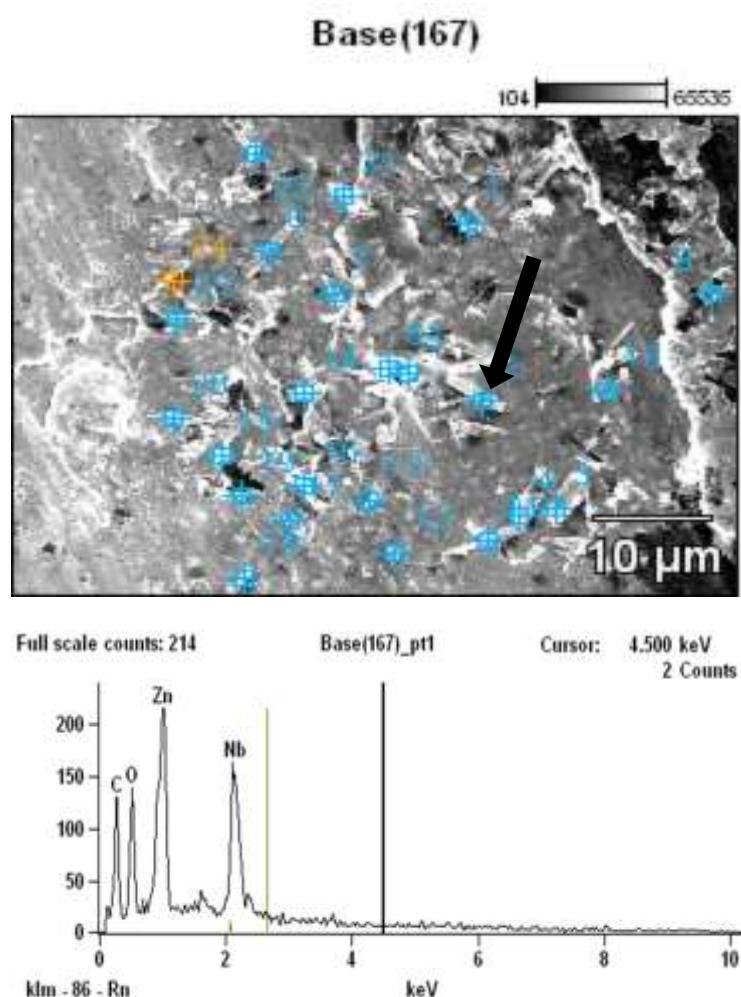


Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfil obtido em EDX para uma partícula selecionada, a partir de amostra de *Arsenicum album* 6CH - vidro. Os pontos numerados representam as micropartículas identificadas sobre o *stub*.

3.8 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas- Luminex-Magpix®

Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos infectados foram colhidos após 48 horas para centrifugação e congelamento em freezer -80°C, para posterior dosagem de citocinas. A dosagem foi realizada pelo método MAGPIX-Luminex® (kit Milliplex e- Bioscience mouse cytokine Magnet®, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. O kit inclui os sistemas de detecção para as seguintes citocinas: IFN gama, IL1 alfa, IL1 beta, IL6, IL10, IL12(p40), IL12(p70), MCP1, MIP-1 beta, GM-CSF, RANTES, VEGF, TNF alfa. As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em pg/ml. Amostras com quantidades abaixo do limite de detecção foram registradas como “zero” e amostras acima do limite determinado pela curva padrão foram registrados com o valor mais alto da curva.

3.9 Acuspointer Ryodoraku

Esse aparelho é utilizado para avaliação da atividade de meridianos na acupuntura, com base na condutividade da pele em pontos específicos. O resultado é mensurado em microampères (M/A) e a calibração do equipamento antes de cada mensuração é feita em 200 M/A. Neste estudo o Ryodoraku foi adaptado para que seus dois cabos de transmissão fossem fixados a agulhas de acupuntura (30x40mm), transfixadas em uma base de cera isolante presa em uma estrutura fixa, no intuito de garantir a estabilidade e o exato paralelismo das agulhas. Esse método foi realizado dentro do fluxo laminar mantendo aparelhos eletrônicos a 2 metros de distância do local da medição, para evitar que eventuais campos magnéticos influenciassem no resultado. Dentro do fluxo laminar foi colocado um higrômetro para o controle de temperatura e umidade do local. O padrão de temperatura observado foi de 24.8°C em média e umidade a 57%. As amostras foram alocadas em criotubos de fundo chato, em triplicata. As agulhas foram inseridas no líquido sem que as mesmas tocassem as paredes do tubo. Aguardaram-se 5 segundos após a introdução da agulha na amostra até que o aparelho se estabilizasse. Dessa forma, a condutividade medida correspondeu exatamente à condutividade do líquido.

3.10 Análise Estatística

Os dados paramétricos foram analisados pelo teste Anova/Tuckey-Krammer, e os dados não paramétricos foram analisados pelo método Kruskal-

Wallis/Dunn, de acordo com o resultado do teste de Bartlett. Em todos os casos, os valores $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram processadas no *software* Prism 5.0.

4 RESULTADOS

Avaliação do spreading e da fagocitose *in vitro*

O medicamento *Arsenicum album* 30K dinamizado em frasco de plástico e a água dinamizada em frasco de vidro produziram aumento do spreading (área celular) dos macrófagos, em relação aos controles ($p<0.05$). O índice fagocítico não apresentou significância estatística entre os grupos (**Figuras 2 e 3**).

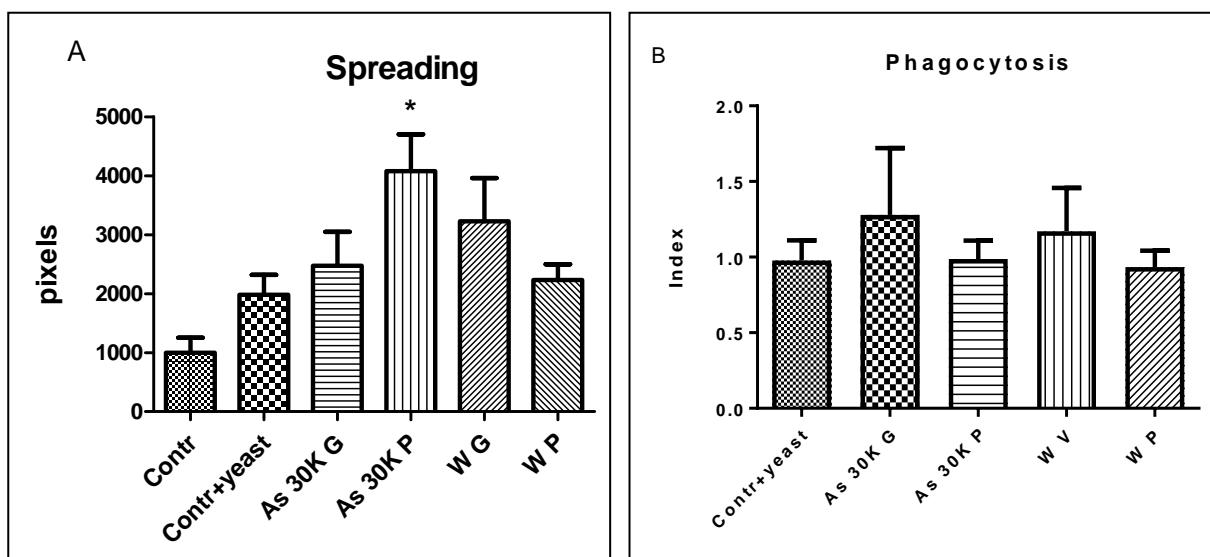


Figura 2 - Spreading dos macrófagos em pixels (A) e index fagocítico (B) de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com *Arsenicum album* 30K. Os valores representam média e erro padrão. Contr = apenas macrófagos, Contr+yeast = macrófagos co-cultivados com levedura, As 30K G = *Arsenicum album* 30K – vidro, As 30K P = *Arsenicum album* 30K – plástico, WG = água dinamizada – vidro, WP = água dinamizada - plástico. Os macrófagos e as leveduras foram mensurados no software Metamorph®. Kruskal-Wallis / Dunn, * $p<0.05$ em relação ao controle.

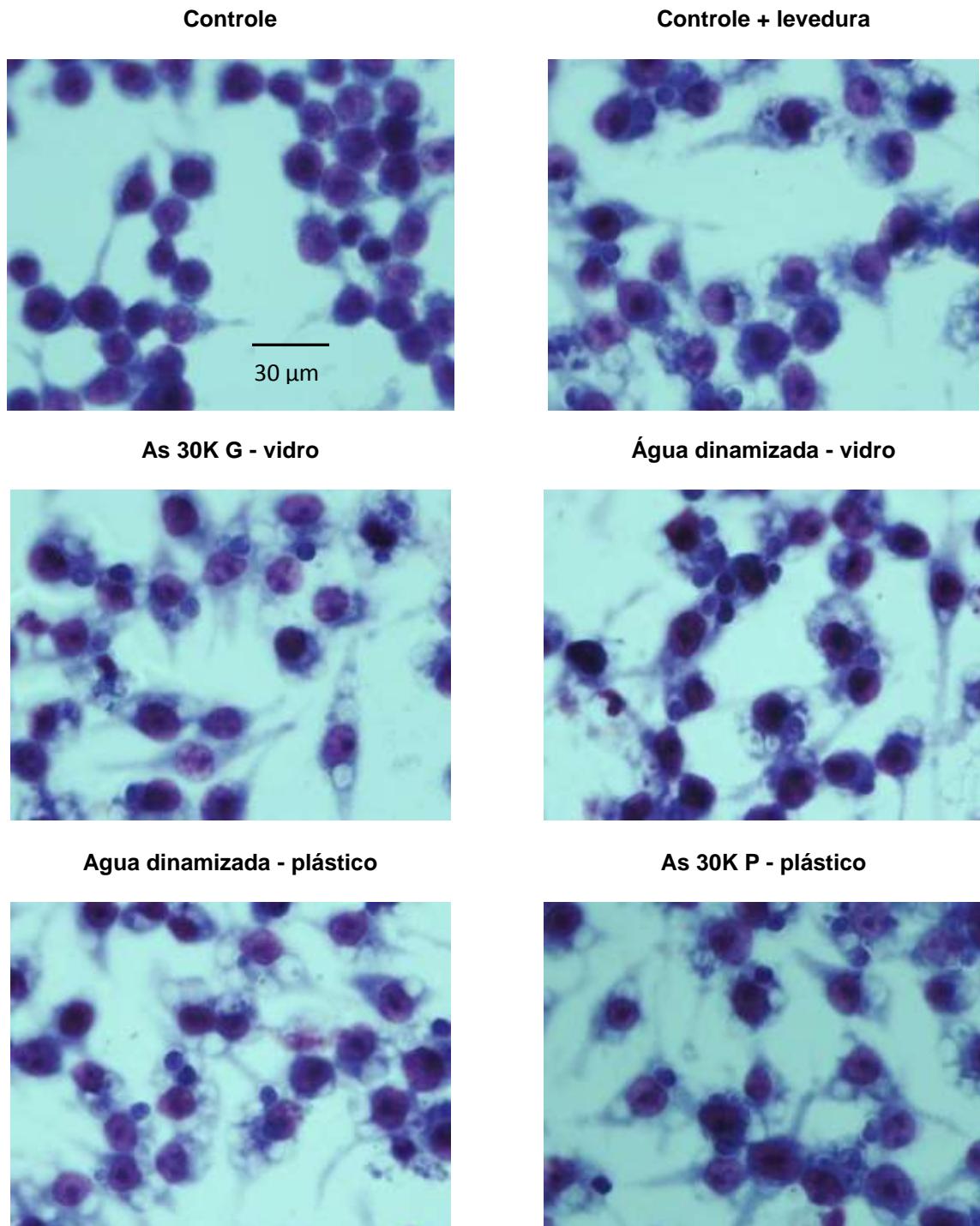


Figura 3- Morfologia de células mantidas em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* coradas pela coloração de Giemsa no tempo de 48hs de incubação. Objetiva 100X.

Não foram observadas diferenças entre os grupos na dosagem de óxido nítrico, em 24 horas e 48 horas de incubação (**Figura 4**).

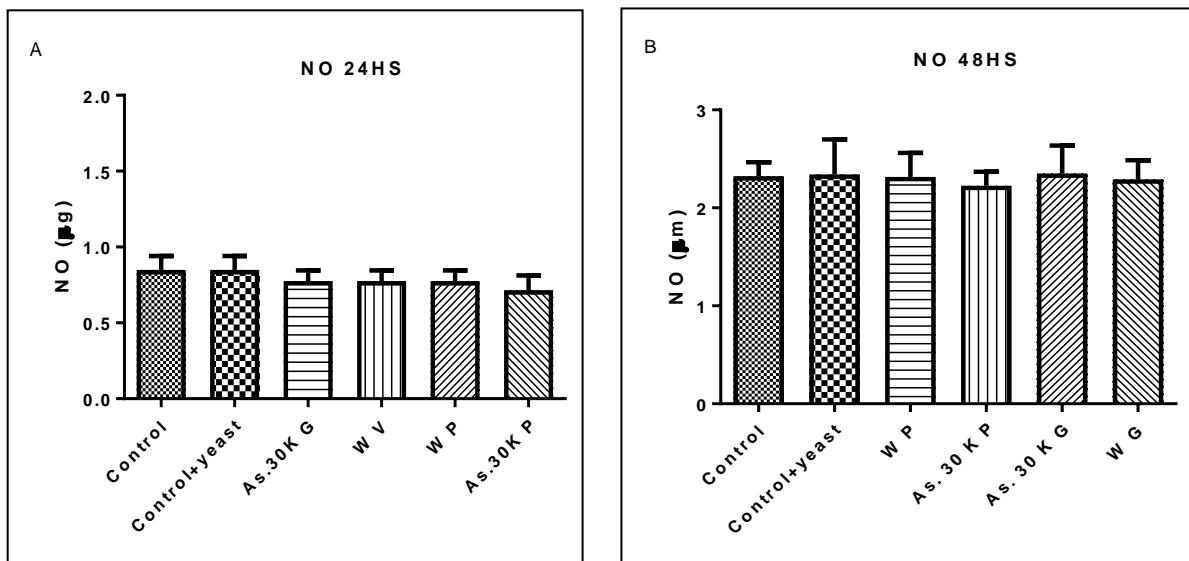


Figura 4 - Dosagem de óxido nítrico (μg para 10^5 células) no sobrenadante de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes tempos: 24 horas **(A)**, 48 horas **(B)**. Control = apenas macrófagos, Control+yeast = macrófagos co-cultivados com levedura, WP = água dinamizada - plástico, As 30K P = *Arsenicum album* 30K - plástico, As 30K G = *Arsenicum album* 30K - vidro, WG = água dinamizada - vidro. Kruskal-Wallis/Dunn, sem significância.

Os medicamentos *Arsenicum album* 6CH dinamizado em frasco de vidro e plástico não apresentaram significância entre os grupos em relação ao spreading e o índice fagocítico (**Figuras 5 e 6**).

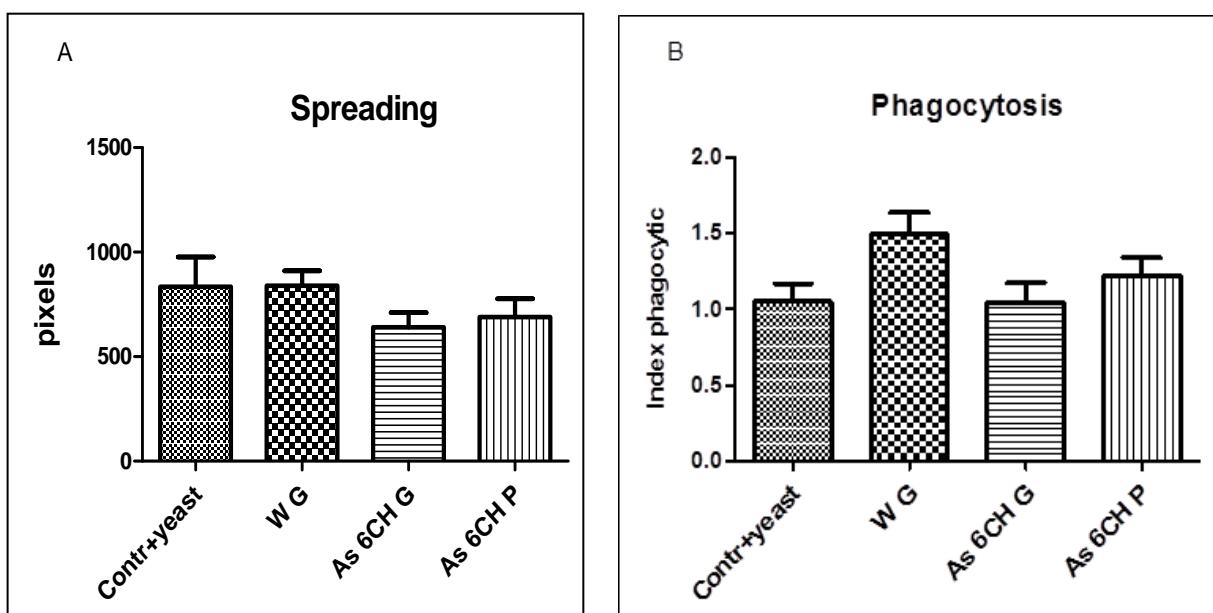


Figura 5 - Spreading dos macrófagos (pixels) (A) e índice fagocítico (B) de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com *Arsenicum album* 6CH. Os valores representam média e erro padrão. Contr+yeast = macrófagos co-cultivados com levedura, WG = água dinamizada - vidro, As 6CH G = *Arsenicum album* 6CH - vidro, As 6CH P = *Arsenicum album* 6CH - plástico. Os macrófagos e as leveduras foram mensurados no software Metamorph®. Kruskal-Wallis /Dunn (spreading), ANOVA/Tukey Krammer (Index fagocítico), sem significância.

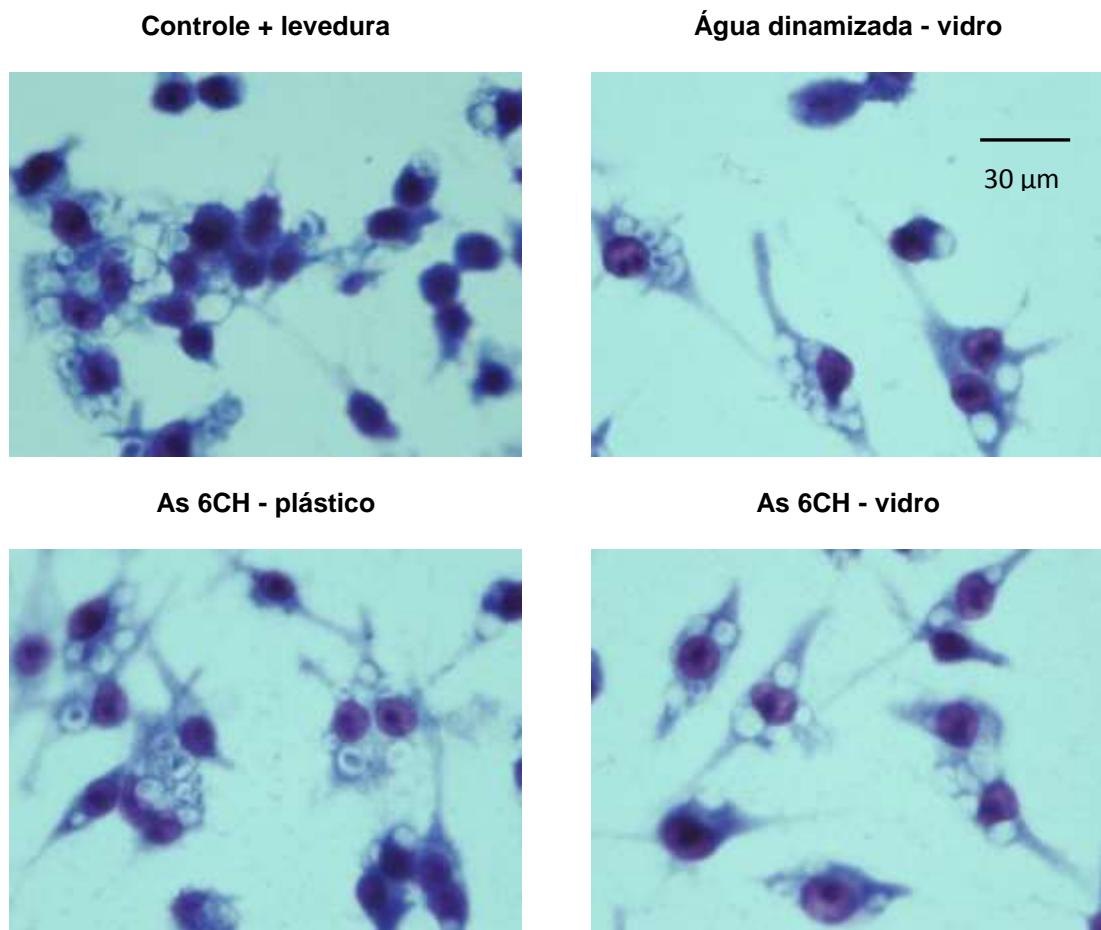


Figura 6- Morfologia de células mantidas em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* coradas pela coloração de Giemsa no tempo de 48 horas de incubação. Objetiva: 100X.

Não foram observadas diferenças entre os grupos na dosagem de óxido nítrico, em 48 horas de incubação (**Figura 7**).

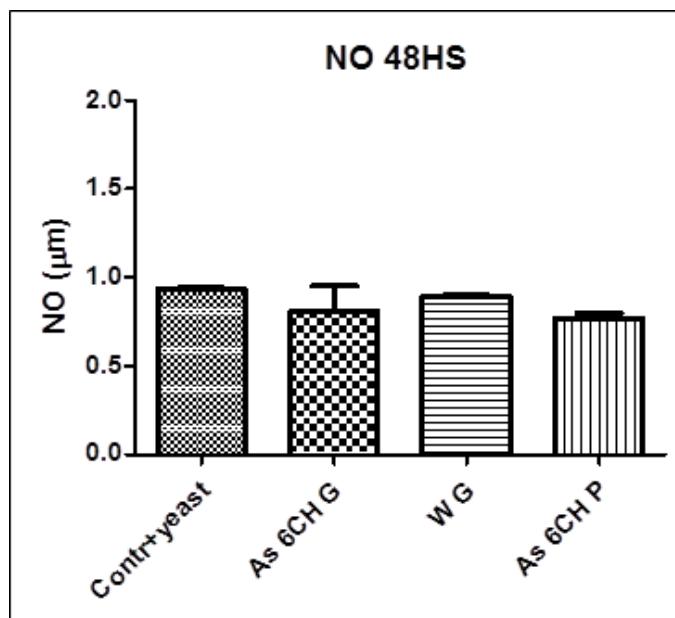


Figura 7 - Dosagem de óxido nítrico (μg para 10^5 células) no sobrenadante de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* após 48 horas. Os valores representam média e erro padrão. Control + yeast = macrófagos co-cultivados com levedura, As 6CH G = *Arsenicum album* 6CH - vidro, WG = água dinamizada - vidro, As 6CH P = *Arsenicum album* 6CH - plástico. ANOVA/Tukey Krammer, sem significância.

As citocinas MCP-1, IL1 alfa e IL-6 mostraram aumento estatisticamente significante após 48 horas do tratamento com *Arsenicum album* 6CH. Os peptídeos GM-CSF e VEGF mostraram clara tendência de aumento, mas sem significância estatística, em função da variância apresentada (**Tabela 1, Figura 8**).

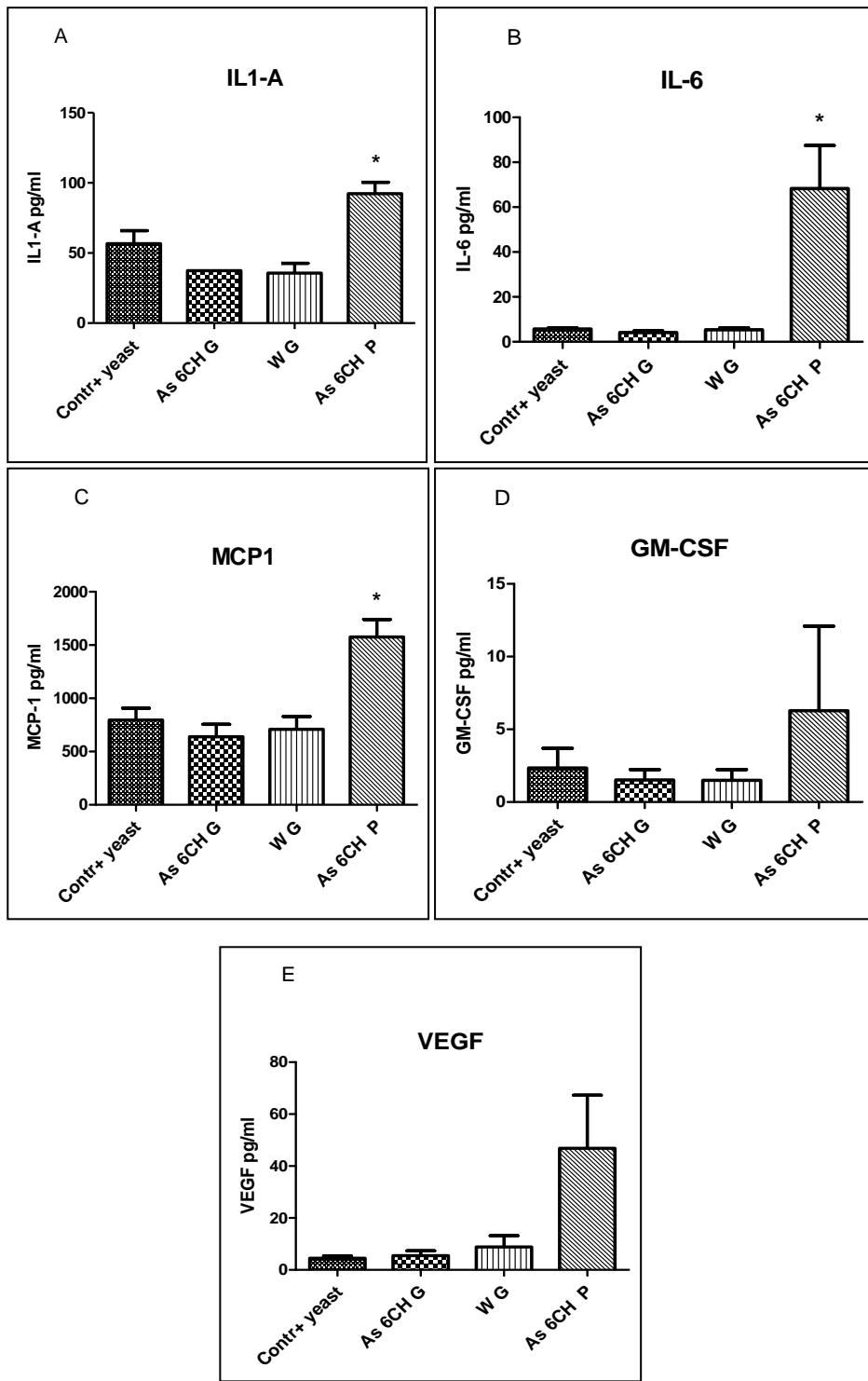


Figura 8 – Concentrações de **(A)** IL1 alfa, **(B)** IL-6, **(C)** MCP1, **(D)** GM-CSF, **(E)** VEGF no sobrenadante (pg/ml) obtido a partir da co-cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e tratados com *Arsenicum album* 6CH dinamizado em frascos de vidro e plástico. Os valores representam média e erro padrão. ANOVA/Tukey Krammer, *p<0.05 em relação ao controle.

Tabela 1- Citocinas dosadas a partir do sobrenadante de culturas de macrófagos tratadas com *Arsenicum album* 6CH após 48 horas. Contr+lev = controle levedura; As 6CH G = *Arsenicum album* 6CH preparado em frasco de vidro, As 6CH P = *Arsenicum album* 6CH preparado em frasco de plástico; WG = água dinamizada em frasco de vidro. ANOVA, Tukey-Krammer, $p \leq 0,002$ em relação ao controle.

Citocinas		Contr+ lev	As 6CH G	W G	As 6CH P
gIFN	Média	4,553	4,69	4,753	4,11
	SD	1,197	0,729	1,361	0,968
IL1α	Média	56,646	37,38	35,71	92,34
	SD	16,029	0	12,135	13,948
IL1β	Média	21,973	11,18	21,973	23,283
	SD	16,190	9,249	16,190	14,278
IL-6	Média	5,68	4,16	5,356	68,256
	SD	0,953	1,255	1,516	33,206
IL-10	Média	3,613	3,276	3,59	3,983
	SD	1,252	0,390	0,900	0,659
IL-12 (p40)	Média	6,016	4,63	5,296	4,445
	SD	2,303	0,744	1,469	0,346
IL-12 (p70)	Média	10,866	4,533	5,69	5,423
	SD	9,537	1,218	1,748	2,181
MCP1	Média	795,33	638,66	709	1576,33
	SD	193,08	202,74	209,18	286,19
MIP-1β	Média	127,27	12647,33	135,53	13796,33
	SD	768,09	494,53	1899,86	643,127
GM-CSF	Média	2,346	1,513	1,49	6,276
	SD	2,327	1,241	1,281	10,074
RANTES	Média	261,33	262	209,33	352,66
	SD	58,526	75,438	41,594	104,57
VEGF	Média	4,48	5,466	8,84	46,843
	SD	1,532	3,285	7,483	35,433
TNFα	Média	890,66	760	793,66	714
	SD	139,95	113,84	142,87	65,505

As células coradas a fresco pelo alaranjado de acridina e analisadas em microscopia de fluorescência também não apresentaram diferenças morfológicas significativas entre os grupos, sendo que poucos vacúolos ácidos foram observados (**Figura 9**).

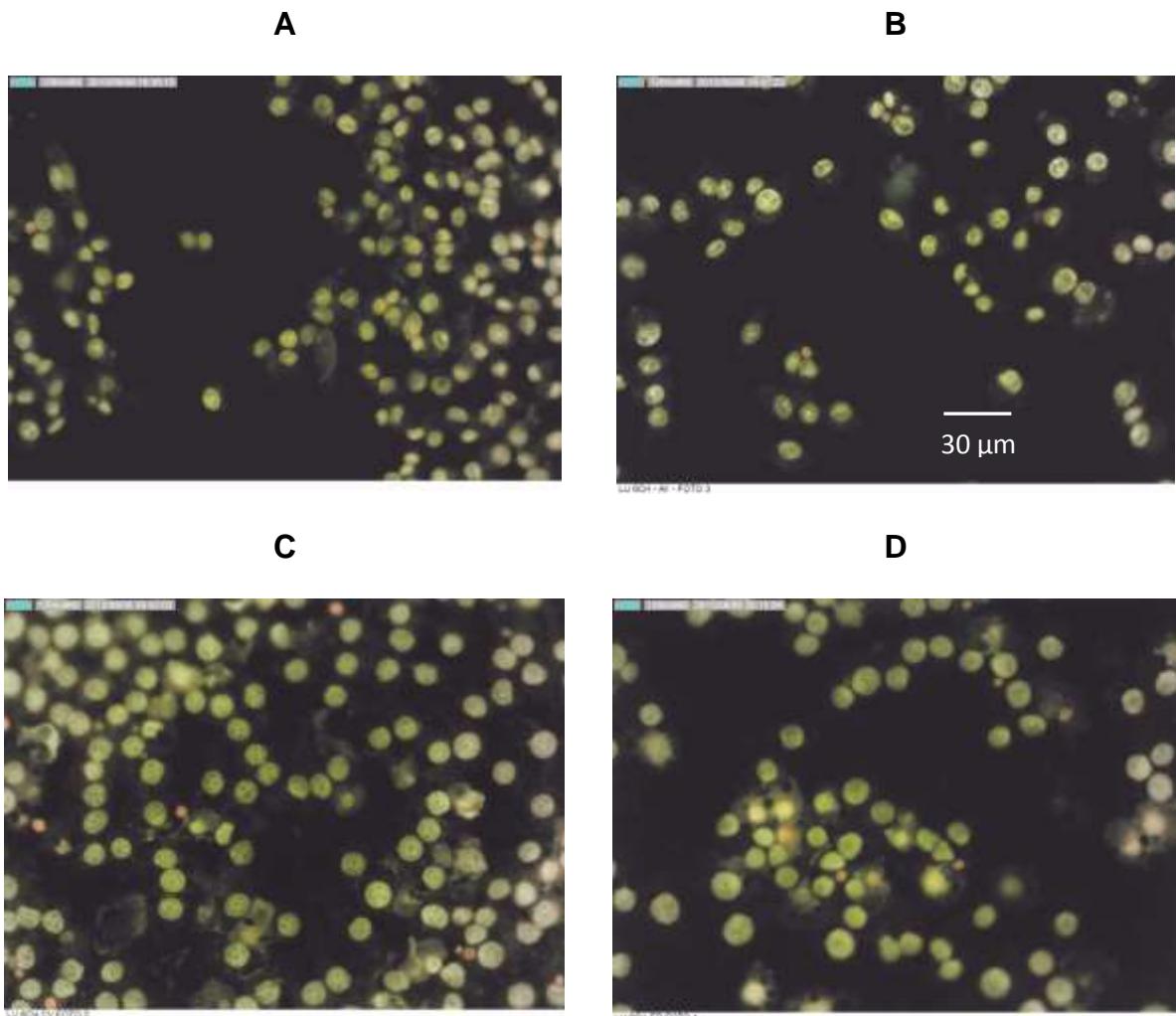


Figura 9- Fotomicrografia de macrófagos RAW 264.7 co-cultivados com leveduras por 48 horas e tratados com *Arsenicum album* 6CH. Imagem obtida por microscopia de fluorescência de células coradas a fresco com alaranjado de acridina. **(A)** Macrófagos co-cultivados com leveduras; **(B)** *Arsenicum album* 6CH – vidro; **(C)** água dinamizada – vidro; **(D)** *Arsenicum album* 6CH – plástico. Objetiva 40x.

Células tratadas com *Arsenicum album* 200CH, dinamizado em frasco plástico, apresentaram aumento do *spreading* (área celular, $p<0.05$) e do índice fagocítico ($p<0.05$) em relação aos macrófagos tratados com o mesmo medicamento dinamizado em vidro (**Figuras 10 e 11**).

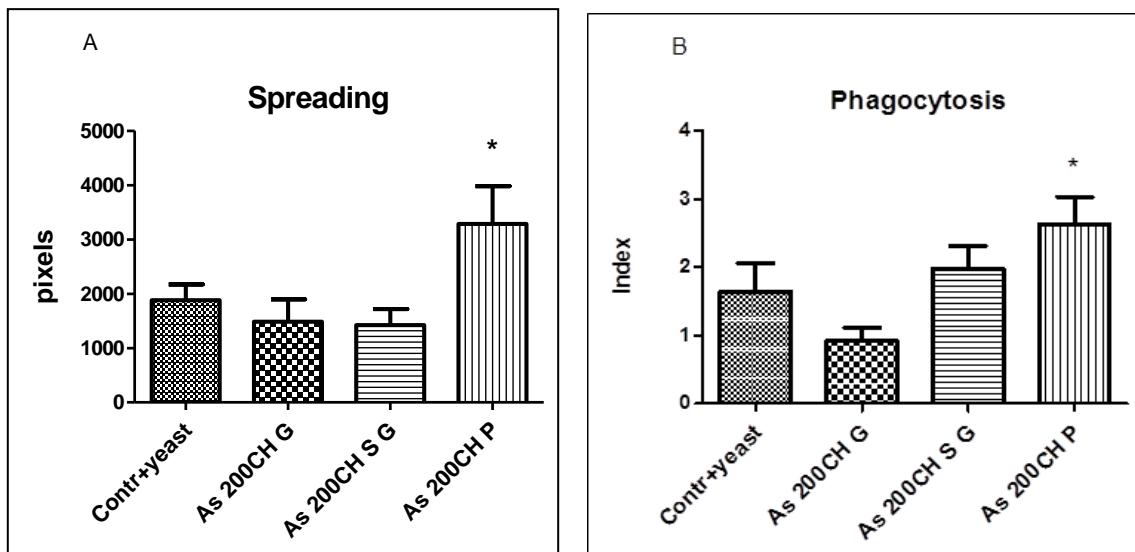


Figura 10- Spreading dos macrófagos (pixels) **(A)** e index fagocítico **(B)** de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com *Arsenicum album* 200CH. Os valores representam média e erro padrão. Contr.+yeast = macrófagos co-cultivados com levedura, As 200CH G = *Arsenicum album* 200CH - vidro, As 200CH S G = *Arsenicum album* 200CH dinamizado em vidro e centrifugado, As 200CH P = *Arsenicum album* 200CH - plástico. Os macrófagos e as leveduras foram mensurados no software Metamorph®. Kruskal-Wallis/Dunn *p<0.05 em relação ao As 200CH - vidro.

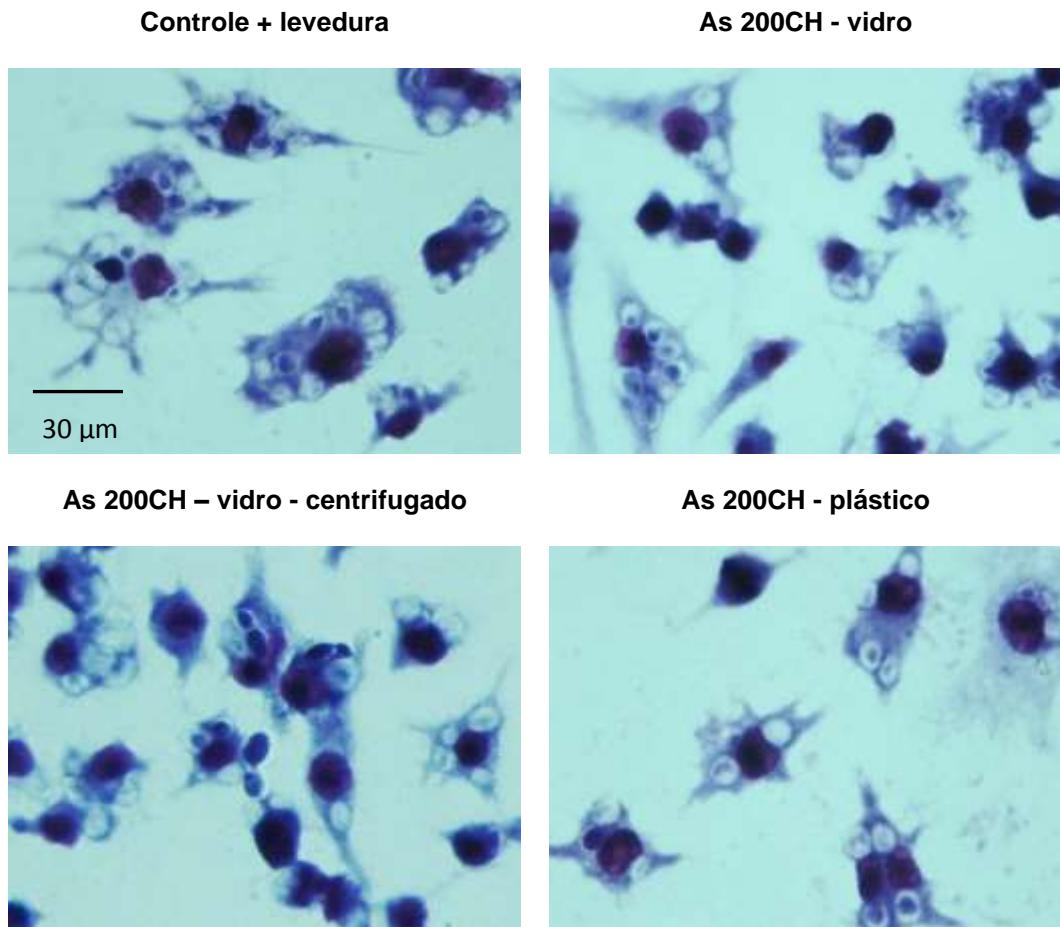


Figura 11- Morfologia de células mantidas em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* coradas pela coloração de Giemsa no tempo de 48 horas de incubação. Objetiva: 100X.

Foram observadas diferenças entre os grupos na dosagem de óxido nítrico após 48 horas de incubação. Houve aumento significativo dos níveis de NO produzidos em co-culturas tratadas com o medicamento *Arsenicum album* 200CH dinamizado em frasco plástico ($*p<0.05$) em relação às co-culturas tratadas com *Arsenicum album* 200CH - vidro (**Figura 12**).

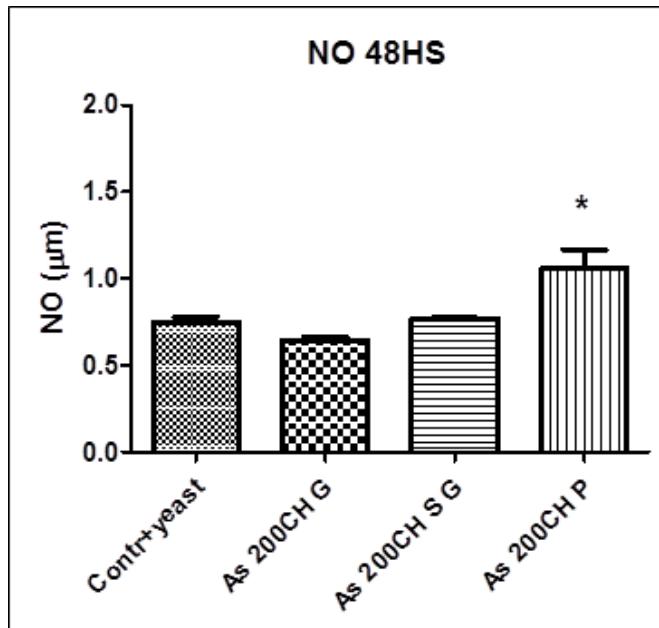


Figura 12- Dosagem de óxido nítrico (μg por 10^5 células) no sobrenadante de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e *Saccharomyces cerevisiae* após 48 horas. Os valores representam média e erro padrão. Contr+yeast = macrófagos co-cultivados com leveduras, As 200CH G = *Arsenicum album* 200CH - vidro, As 200CH S G = *Arsenicum album* 200CH centrifugado, As 200CH P = *Arsenicum album* 200CH - plástico. Kruskal-Wallis/Dunn * $p<0.05$ em relação ao medicamento *Arsenicum album* 200CH - vidro.

As citocinas IL-6, MCP-1, RANTES e IL1-B mostraram tendência clara de diminuição em todos os tratamentos testados em relação ao controle não tratado; porém, sem apresentar significância estatística, em função das variâncias observadas (**Figura 13, Tabela 2**).

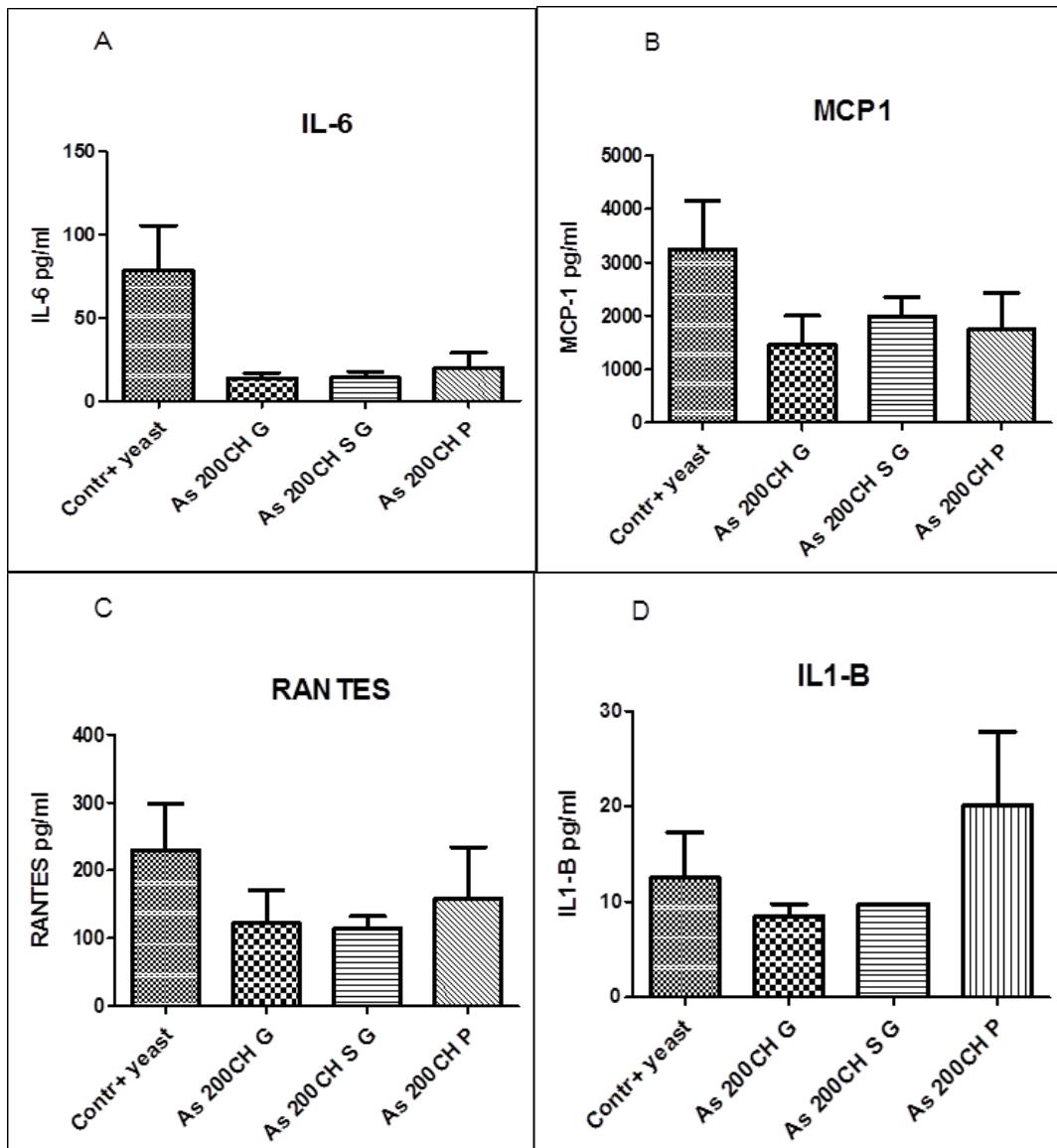


Figura 13- Concentração de **(A)** IL-6, **(B)** MCP1, **(C)** RANTES, **(D)** IL1-B (pg/ml) no sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com o medicamento *Arsenicum album* 200CH. Contr+yeast = macrófagos co-cultivados com leveduras, As 200CH G = *Arsenicum album* 200CH - vidro, As 200CH S = *Arsenicum album* 200CH centrifugado, As 200CH P = *Arsenicum album* 200CH - plástico. Kruskal-Wallis.

Tabela 2- Citocinas dosadas a partir do sobrenadante de culturas de macrófagos tratadas com *Arsenicum album* 200CH após 48 horas. Contr+lev = controle levedura, As 200CH G = *Arsenicum album* 200CH preparado em frasco de vidro, As 200CH P = *Arsenicum album* 200CH preparado em frasco de plástico, As 200CH SG = *Arsenicum album* 200CH preparado em frasco de vidro e centrifugado. Kruskal-Wallis.

Citocinas		Contr+ lev	As 200CH G	As 200CH SG	As 200CH P
gIFN	Média	4,753	3,96	5,08	3,22
	SD	1,361	1,096	0,14	4,753
IL1α	Média	77,703	82,063	48,02	71,71
	SD	71,275	70,675	11,208	41,933
IL1β	Média	12,49	8,46	9,77	20,08
	SD	8,349	2,268	0	13,438
IL-6	Média	78,483	13,783	13,96	19,563
	SD	46,635	5,223	6,733	16,423
IL-10	Média	4	4,36	3,616	3,816
	SD	0,939	1,554	0,438	0,254
IL-12 (p40)	Média	4,853	4,893	4,286	4,226
	SD	1,422	1,802	0,367	0,790
IL-12 (p70)	Média	7,86	6,063	6,393	6,846
	SD	3,629	4,210	0,785	0,785
MCP1	Média	3237	1453	1985,33	1742,66
	SD	1574,47	940,16	637,47	1181,31
MIP-1β	Média	14675,33	13161,66	14763,33	13758,33
	SD	1302,98	1685,76	203,492	3076,77
GM-CSF	Média	0,373	1,05	1,05	0,12
	SD	0,150	1,021	1,021	0,069
RANTES	Média	230	121,97	114,12	157,50
	SD	118,82	84,36	31,33	133,21
VEGF	Média	8,396	8,316	8,19	5,88
	SD	6,612	3,901	1,535	1,741
TNFα	Média	1765	1345,66	1448,33	1536,33
	SD	474,00	509,482	248,06	849,132

A observação das células à microscopia de fluorescência após coloração pelo alaranjado de acridina revelou maior atividade celular, com vacúolos ácidos evidentes e fluorescentes, nos grupos tratados com *Arsenicum album* 200CH dinamizado em plástico e vidro, em relação ao controle. Um padrão menos ativo foi observado nas células tratadas com *Arsenicum album* 200CH dinamizado em vidro e submetido à centrifugação (fase superficial do líquido) (**Figura 14**).

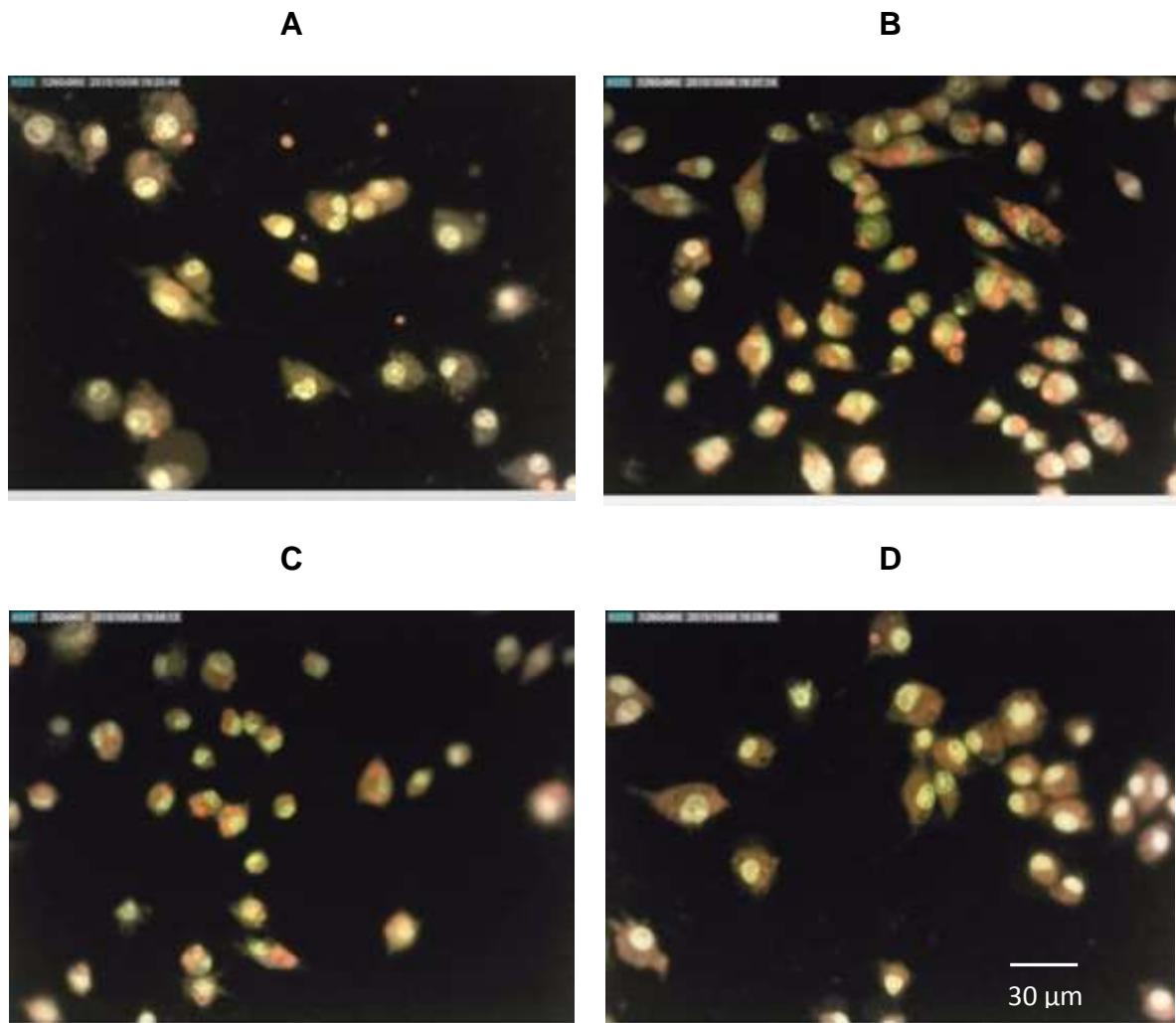


Figura 14- Fotomicrografia em microscopia de fluorescência de células coradas a fresco pelo método alaranjado de acridina. **(A)** Macrófagos co-cultivados com leveduras, **(B)** *Arsenicum album* 200CH - plástico, **(C)** *Arsenicum album* 200CH - vidro, **(D)** *Arsenicum album* 200CH - vidro - sobrenadante após ultra-centrifugação. Objetiva 40x.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX)

As análises obtidas pelos métodos MEV e EDX com os medicamentos *Arsenicum album* 200CH - vidro, *Arsenicum album* 200CH - vidro / sobrenadante após ultra-centrifugação e *Arsenicum album* 200CH - plástico mostraram que partículas de diferentes composições são identificadas randomicamente em todos os medicamentos (% de átomos/partículas), ou seja, não houve um padrão definido de elementos químicos, metais ou não metais, que pudesse ser associado a cada medicamento, recipiente e à sua atividade biológica.

Somente as amostras de *Arsenicum album* 200CH - vidro apresentaram partículas contendo traços de sílica (**Figura 15**).

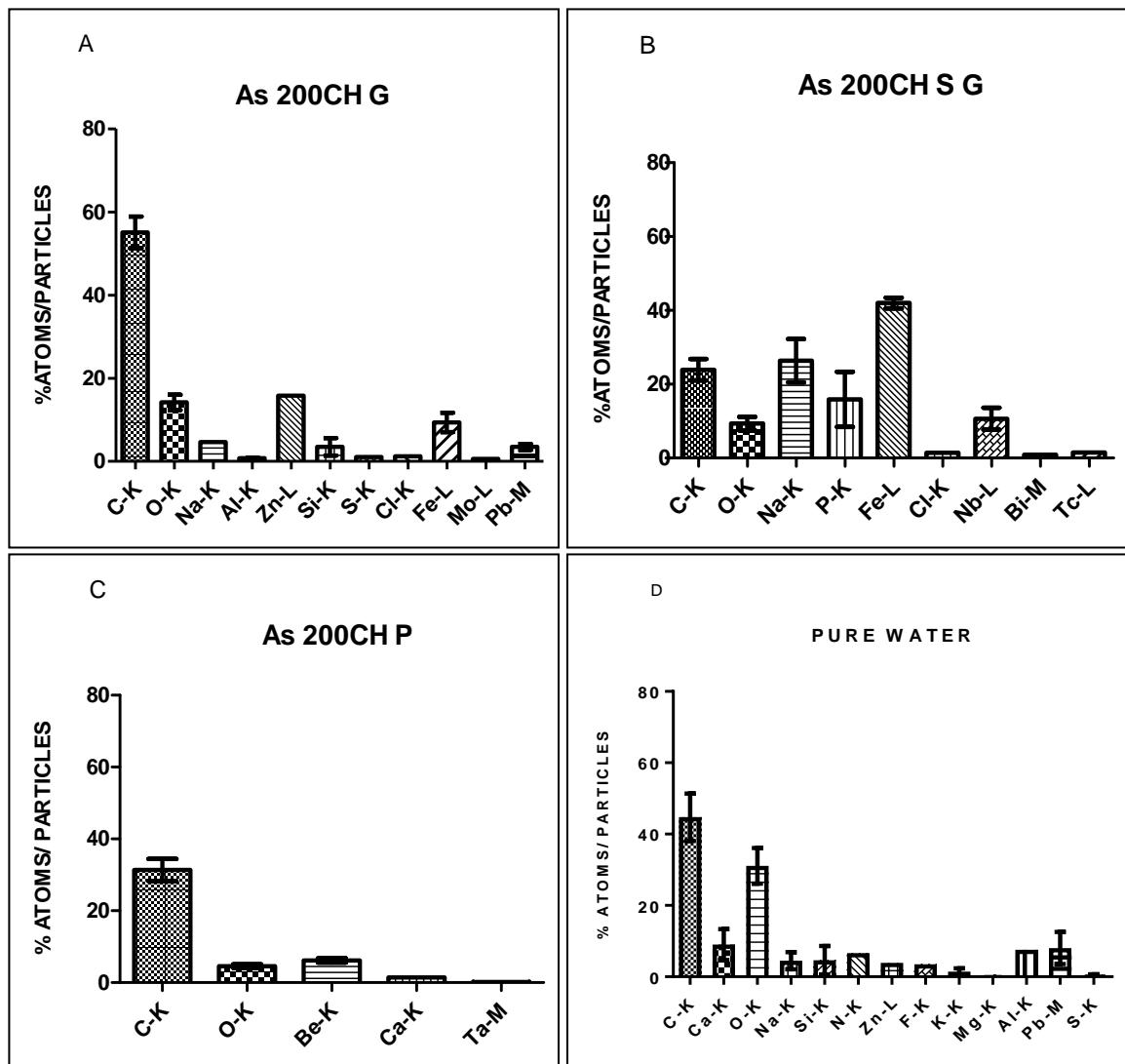


Figura 15- Identificação de elementos químicos (% de átomos) por micropartícula. As micropartículas foram obtidas a partir do sedimento dos medicamentos previamente centrifugados. Análises feitas pelo método Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX). **(A)** *Arsenicum album* 200CH - vidro, **(B)** *Arsenicum album* 200CH - vidro - sobrenadante após ultra-centrifugação, **(C)** *Arsenicum album* 200CH - plástico, **(D)** Água pura.

Por meio da medição em microampères (M/A) da condutância dos medicamentos homeopáticos dinamizados no momento da análise, identificou-se

que a água pura filtrada apresenta condutividade igual a 100 M/A, com pequena variação. Esse valor de condutância, portanto, serviu de padrão de comparação para os demais medicamentos. A maior condutividade foi observada no medicamento *Arsenicum album* 200CH vidro - sobrenadante após ultracentrifugação, sendo estatisticamente significante em relação à água pura filtrada.

O álcool 70% apresentou metade da condutância da água, independentemente da filtração e/ou da dinamização. Interessante notar que a própria dinamização da água produziu redução de cerca de 25% da sua condutância.

Especula-se que a formação de micro e nanobolhas após a dinamização possa interferir na condução do impulso elétrico pelo líquido. Os medicamentos *Arsenicum album* 30K, 6CH e 200CH dinamizados em frascos de plástico apresentaram redução de 40 a 50% na condutância ($*p<0.05$), em relação à água pura filtrada.

A diferença de condutância entre o medicamento *Arsenicum album* 200CH dinamizado em plástico e o mesmo medicamento dinamizado em vidro e centrifugado foi ainda mais significativa ($*p<0.0001$), indicando que as mudanças de condutividade dos medicamentos mostram correlação com a presença de microestruturas mais ou menos polares no líquido analisado (**Figura 16**).

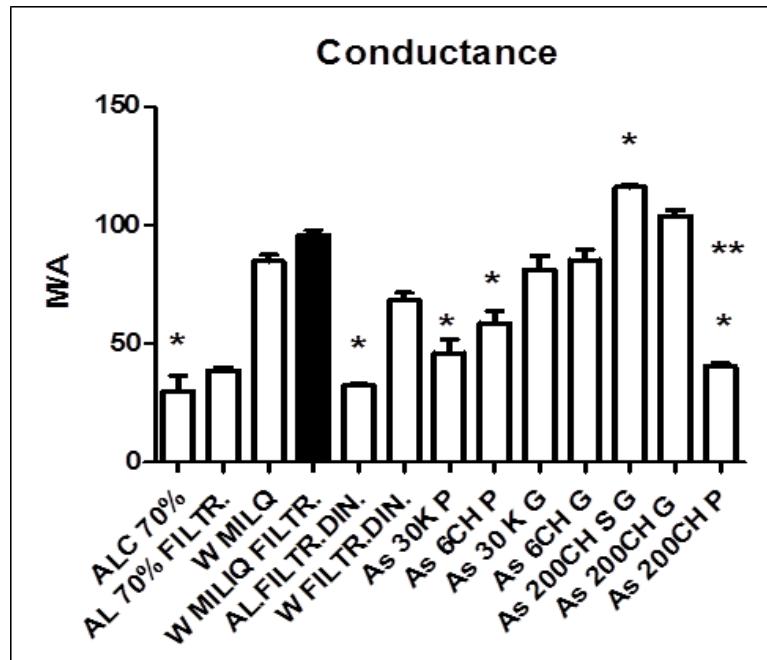


Figura 16- Condutância dos medicamentos homeopáticos foram mensurados pelo método Ryodoraku®. Os valores representam média e erro padrão. W MILLQ = água pura, W MILLQ FILTR. = água pura filtrada em filtro 22 µm (Millipore®), W FILTR DIN. = água pura filtrada em filtro 22 µm (Millipore®) e dinamizada em braço mecânico Denise®. Kruskal-Wallis/Dunn *p<0.05 em relação à água filtrada e **p<0.0001 em relação ao medicamento *Arsenicum album* 200CH vidro - sobrenadante após ultra-centrifugação.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir das análises de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e leveduras tratadas com *Arsenicum album* 30K dinamizado em plástico mostraram aumento do *spreading* sem alterações na atividade fagocítica. Tais efeitos também foram independentes da produção de óxido nítrico (NO), medido indiretamente pela produção de nitrito e nitrato, sugerindo fortemente que a ativação macrofágica resultou da provável estimulação dessas células por componentes orgânicos provavelmente desprendidos do material plástico durante as sucessivas sucussões do mesmo frasco, uma vez que a escala Korsakoviana é preparada dessa forma. Especula-se, também, que parte desses contaminantes derivados do plástico tenha sido liberada durante a desinfecção dos frascos por calor. Por outro lado, dados mostram que garrafas de tereftalato de polietileno (PET) submetidas a altas temperaturas (de 40°C a 60°C graus) não apresentam nenhuma atividade citotóxica ou disruptora endócrina [44]. Dessa forma, a participação de componentes do plástico na atividade biológica das amostras e sua viabilidade para uso rotineiro em farmácias homeopáticas é tema para estudos futuros. Nota-se que a água dinamizada também apresentou efeito residual sobre o *spreading*, o que poderia ser atribuído à ação inespecífica de micro e nanobolhas identificadas nessas preparações [46].

Efeitos diretos dos medicamentos sobre as leveduras são poucos prováveis nesse caso, tendo em vista que experimentos prévios realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com o medicamento *Arsenicum album* nas potências 8x e 16x revelaram ausência de modificações no seu crescimento [46]. Por outro lado, Damin e colaboradores [47] avaliaram o crescimento de *Metarhizium anisopliae* sob os efeitos do tratamento com *Arsenicum album* na potência 24CH e observaram maior crescimento de conídios em relação ao controle.

Nas situações de co-cultura entre macrófagos da linhagem RAW 264.7 e micro-organismos, há que se considerar a grande sensibilidade dessas células a tais estímulos. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* mostraram ser um bom modelo para avaliar efeitos inespecíficos dos medicamentos homeopáticos, como visto em nosso estudo. Essa proposição é baseada em estudos-piloto realizados previamente comparando a atividade dos medicamentos *Zincum metallicum*,

Timulina e *Antimonium crudum* sobre o mesmo modelo biológico. Em nenhum dos casos, foi possível observar efeitos sobre a interação macrófago-levedura, ao contrário do que se observou em co-culturas de macrófagos e *Leishmania amazonensis* [48]. Também macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS apresentam aumento significativo na produção de óxido nítrico *in vitro*, como também macrófagos de cultura primária infectados BCG apresentam aumento de proteínas pró-apoptóticas, anti-apoptóticas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Células de adenocarcinoma mamário, de pulmão e de fígado incubadas com macrófagos e tratadas com o medicamento Ferumoxytol resultaram em aumento da atividade de Caspase 3, peróxido de hidrogênio e diminuição significativa de citocinas pró-inflamatórias IL-10, resultando na redução do tumor, sendo tais efeitos atribuídos à presença de nanopartículas de Ferro no medicamento [49, 50, 51].

Neste trabalho, a avaliação da atividade macrofágica em co-cultura com as leveduras, frente ao tratamento com *Arsenicum album* 200CH preparado em frasco plástico, mostrou aumento no *spreading* e no índice fagocítico. Assim, houve aumento da área celular após 48 horas de incubação, comparando-se com o controle não tratado, sugerindo que contaminantes liberados pelo plástico possam estar relacionados ao aumento da atividade fagocítica, uma vez que o mesmo medicamento preparado em vidro não apresentou os mesmos resultados.

A observação das células à microscopia de fluorescência mostrou outro dado interessante: macrófagos tratados com *Arsenicum album* 200CH dinamizados em frascos de vidro e plástico exibem os mesmos padrões morfológicos, com presença de vacúolos ácidos evidentes no citoplasma; contudo, um padrão menos ativo foi observado com o medicamento *Arsenicum album* 200CH dinamizado em frasco de vidro e centrifugado (fase superficial). Conforme se constatou na análise das micropartículas presentes em suspensão, a ultracentrifugação do *Arsenicum album* 200CH dinamizado em frasco de vidro modificou a composição do medicamento, o que poderia justificar tais diferenças morfológicas. Paralelamente, essa preparação mostrou aumento na condutância em relação aos demais medicamentos e maior porcentagem de íons ferro nas micropartículas identificadas pela MEV. Embora não se possam extrair conclusões exatas sobre a participação do ferro na atividade dos macrófagos,

esse dado abre espaço para uma importante discussão que emerge das pesquisas sobre medicamentos homeopáticos em sistemas biológicos mantidos *in vitro*: a análise da composição dos medicamentos em termos de micro e nanopartículas mostra-se como uma importante ferramenta de controle de qualidade das amostras em estudo, a fim de se descartar resultados falso-positivos, mesmo que não seja conclusiva quanto ao mecanismo de ação de tais medicamentos.

Estudos anteriores mostram que sucessivas diluições e sucussões podem interferir na condutibilidade e nas propriedades físico químicas da amostra; o tempo de exposição do soluto ao solvente também interfere na condutividade, possivelmente devido à formação de aglomerados ou *clusters* da própria água, independentemente da presença de partículas. Outras mudanças físico-químicas também podem ser observadas pelos métodos de colorimetria e espectroscopia UV [52, 53, 54]. Um estudo feito com o medicamento *Ferrum metallicum* nas potências 6C, 30C, 200C, 1MC, 10MC e 50MC, após análise em microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia por energia dispersiva de Raio X (EDX), mostrou que todas as potências apresentavam nanopartículas em abundância dentro da faixa de tamanho de pontos quânticos, exceto a potência 50MC que apresentou partículas maiores [55]. Segundo Paul *et al* [31], partículas de *Ferrum metallicum* em preparações homeopáticas podem ser usadas para armazenar cargas altas de energia, mas ainda não se sabe se tais propriedades têm relação com o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos.

Após a dosagem das citocinas, observou-se o predomínio de perfil pro-inflamatório no tratamento com *Arsenicum album* 6CH dinamizado em frascos plásticos, com aumento significante nas concentrações de IL1-alfa, IL-6 e MCP-1 no sobrenadante dessas culturas, além de clara tendência ao aumento de GM-CSF e VEGF. Essas modificações específicas na expressão de citocinas não guardaram correlação com a produção de NO nem com a atividade celular dos macrófagos (*spreading* e fagocitose). Assim sendo, se os contaminantes plásticos têm algum efeito estimulante sobre as células neste caso, não foram suficientes para provocar mudanças intensas que caracterizassem toxicidade. De qualquer forma, nenhum efeito específico do medicamento homeopático em si

pôde ser demonstrado a partir da potência 6CH, tampouco houve correlação de tais achados com a presença de micropartículas contendo sílica. Um estudo com o medicamento homeopático *Gelsemium sempervirens* nas potências 6CH, 30CH e 200CH apresentou maior quantidade de matérias orgânicas na 30CH e maior potencial zeta negativo (observado pelo método de RNM) na 200CH, ambos em relação ao controle [56]. As potências 2CH como 30CH apresentaram efeitos moduladores *in vitro* em uma série de genes isolados de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) [36]. Observa-se, portanto, que a presença de matéria orgânica nos medicamentos homeopáticos também pode estar associada a seus efeitos *in vitro*.

Em um estudo recente, avaliou-se que células de leucemia monocítica humana da linhagem THP-1, mantidas *in vitro*, têm sua atividade modificada frente ao medicamento homeopático *Arsenicum album* e ao arsênico inorgânico. Os resultados apontaram para aumento das citocinas pró-inflamatórias IL1-beta e TNF-alfa e redução da citocina anti-inflamatória IL10, somente após tratamento das células com arsênico inorgânico em doses ponderais [57]. Ao contrário, em estudo realizado com células da linhagem MT4, observou-se que ambas as potências homeopáticas de *Arsenicum* - 6CH e 200CH - foram capazes de aumentar a viabilidade celular *in vitro*, após intoxicação com arsênico As_2O_3 [58]. Neste trabalho, o *Arsenicum album* 200CH fabricado em frasco de plástico induziu expressivo aumento na atividade celular e oxidativa dos macrófagos mantidos em co-cultura com as leveduras, acompanhado de tendência não significante de diminuição na produção das citocinas: IL6 e MCP-1. Esses dados sugerem uma possível atividade específica do *Arsenicum album* 200CH sobre macrófagos submetidos à interação com elementos patogênicos, o que não foi evidente na interação com leveduras não patogênicas.

Para uma melhor compreensão do papel da sílica no mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos em relação aos efeitos biológicos, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectroscopia por energia dispersiva de Raios-X (EDX) do sedimento das amostras de medicamentos submetidos à centrifugação. O medicamento homeopático *Arsenicum album* 200CH dinamizado em frasco de vidro foi o único que apresentou sílica na composição química das partículas recolhidas do sedimento.

Contudo, a presença de sílica não apresentou relação com os resultados biológicos, no que se refere ao *spreading* e à morfologia exibida à microscopia de fluorescência.

Os resultados obtidos no presente estudo, portanto, mostram ausência de correlação entre a presença de partículas de sílica e a atividade biológica das preparações homeopáticas, tanto específica quanto não especificamente. Assim sendo, infere-se que a sílica poderia não ser o carreador da informação do medicamento homeopático aos sistemas biológicos, ao contrário do que é proposto por vários autores [5, 6, 8, 9, 10, 32, 33, 59]. Há que se considerar que a própria água pode servir de carreador, por meio de propriedades eletromagnéticas derivadas de seu comportamento dipolo [60]. Os achados obtidos das medidas de condutância corroboram essa hipótese, ainda que a presença de partículas e moléculas orgânicas em suspensão também possam interferir nesse parâmetro.

Segundo Smith [61], a água teria uma frequência que pode ser medida (em Hz), gerando uma assinatura para cada preparação homeopática, ressaltando que tal frequência estaria ligada aos efeitos biológicos das altas diluições. Conforme mencionado por Chaplin [62], a água criaria uma “memória” da solução inicial devido à grande formação de *clusters* associados a íons presentes na amostra. Tais *clusters* seriam capazes de gerar ondas eletromagnéticas de baixa intensidade [63]. Mas tais hipóteses também carecem de demonstração.

Segundo Temgire *et al.* [13], medicamentos homeopáticos de ação antineoplásica preparados a partir de sais inorgânicos nas potências de 6CH, 30CH, 200CH e 1M apresentavam sílica em sua composição, conforme observado por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), sugerindo que, dentro das nanobolhas formadas no momento da sucussão, nanopartículas estariam revestidas de silicato e, assim, seriam passadas para potências subsequentes, conforme a hipótese da epitaxia. Essa abordagem se enquadraria nos princípios da nanofarmacologia [64]. Os dados apresentados no presente estudo, por sua vez, contradizem os dados apresentados por este autor, talvez porque as análises tenham sido direcionadas para partículas em escala microscópica e não nanoscópicas. Em suma, muitos estudos utilizando

metodologia refinada, como a ressonância nuclear magnética, ainda são necessários para esclarecer qual das duas hipóteses (epitaxia ou ressonância elétrica) estariam relacionadas ao mecanismo de ação [65, 66, 67, 68], mas os dados obtidos neste estudo dão uma importante contribuição nesse sentido, evidenciando que a participação da sílica no mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos é pouco provável.

6 CONCLUSÃO

Efeitos inespecíficos dos medicamentos preparados em frasco plástico sobre a atividade dos macrófagos foram evidenciados e podem estar relacionados à presença de resíduos orgânicos desprendidos durante a desinfecção e sucussão dos frascos. A participação da sílica desprendida da parede dos frascos de vidro parece improvável. As técnicas utilizadas, como o MEV+EDX e condutância, parecem ser ferramentas úteis para o controle de qualidade de preparações homeopáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Benites N R, Homeopatia In: Spinoza H S, Górnjak S L, Bernardi M. Farmacologia aplicada a medicina veterinária 4^a edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan** 2006; 827-835.
- 2- Romanach K A. Homeopatia em 1000 conceitos 3^a edição São Paulo: **Elcid** 2003; 13-33.
- 3- Filho T, Mariano C, Waisse S. Novas evidências documentais da homeopatia na América Latina: Um estudo de caso sobre os vínculos entre Rio de Janeiro e Buenos Aires. **História ciências saúde- Manguinhos** Rio de Janeiro 2016; 23(3):779-798.
- 4- Bellavite P. Homeopathy and integrative medicine: Keeping an open mind. **J Med Person** 2015; 13(1):1-6.
- 5- Chikramane P S, Suresh A K, Bellare J R, et al. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. **Homeopathy** 2010; 99(4):231-242.
- 6- Upadhyay R P, Nayak C. Homeopathy emerging as nanomedicine. **Int J High Dilution Res** 2011; 10(37):299-310.
- 7- Bhattacharyya S S, Madal S K, Biswas R, et al. In vitro studies demonstrate anticancer activity of an alkaloid of the plant Gelsemium sempervirens. **Exp Biol Med** 2008; 233(12):1591-1601.
- 8- Ives J A, Moffert J R, Arun P, et al. Enzyme stabilization by glass derived silicates in glass-exposed aqueous solutions. **Homeopathy** 2010; 99(1):15-24.
- 9- Demangeat J L. NMR relaxation evidence for solute-induced nanosized superstructures in ultramolecular aqueous dilutions of silica-lactose. **J Mol Liq** 2010; 155(2-3):71-79.
- 10- Liu L, Randolph T W, Carpenter J F. Particles shed from syringe filters and their effects on agitation-induced protein aggregation. **J Pharm Sci** Aug 2012; 101(8): 2952-2959.
- 11- Holandino C, Leal F D, Barcellos B O, et al. Sucussão mecânica versus sucussão manual: um estudo comparativo do comportamento físico-químico de soluções ultradiluídas e dinamizadas. **Cult Homeop** 2007; 19:31-32.
- 12- Witt C M, Ludtke R, Weissuhn T E R, et al. The role of trace elements in homeopathic preparations and the influence of container material, storage, duration and potentisation. **Forsch Komplementärmed** 2006; 13(1):15-21.
- 13- Temgire M K, Suresh A K, Kane S G, et al. Establishing the interfacial nano-structure and elemental composition of homeopathic medicines based on inorganic salts: a scientific approach. **Homeopathy** 2016; 105(2):160-172.
- 14- Perry C C, TUCKER T K. Crystalline silica prepared at room temperature from aqueous solution in the presence of intrasilica bioextracts. **Chem Commun** 1998; 23: 2587-2588.
- 15- Perry C C, TUCKER T K. Model studies of colloidal silica precipitation using biosilica extracts from *Equisetum telmateia*. **Colloid Polym Sci** 2003; 281(7):652-664.
- 16- Khripin C Y, Pristinski D, Dunphy D R, et al. Protein-directed assembly of arbitrary three-dimensional nanoporous silica architectures. **ACS Nano** 2011; 5(2):1401-1409.
- 17- Wang D C, Chen G Y, Chen K Y, et al. DNA as a template in self-assembly of Au nano-structure. **IET Nanobiotechnol** 2011; 5(4):132-135.

- 18- Baca H K, Carnes E C, Ashley C E, et al. Cell-directed assembly: directing the formation of nano/bio interfaces and architectures with living cells. **Biochim Biophys Acta** 2011; 1810(3):259-267.
- 19- Neville F, Broserick M J, Gibson T, et al. Fabrication and activity of silicate nanoparticles and nanosilicate-entrapped enzymes using polyethyleneimine as a biomimetic polymer. **Langmuir** 2011; 27(1):279-285.
- 20- Bhattacharyya S S, Das J, Das S, et al. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from silver nitrate by a homeopathic mother tincture *Phytolacca decandra*. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao** 2012 ; 10(5):546-554.
- 21- Anick D J, Ives J A. The silica hypothesis for homeopathy: physical chemistry. **Homeopathy** 2007; 96(3):189-195.
- 22- Kwon J Y, Kim H L, Lee J Y, et al. Undetectable levels of genotoxicity of SiO₂ nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* test. **International Journal of Nanomedicine** 2014; 9 (2):173-181.
- 23- Belton D J, Deschaume O, Perry C C. An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. **FEBS J** 2012; 279(10):1710-1720.
- 24- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol** 2008; 9:847-856.
- 25- Winter M, Beer H D, Hornung V, et al. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. **Nanotoxicology** 2011; 5(3):326-340.
- 26- Xynos I D, Edgar A J, Buttery L D K, et al. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression in protein synthesis. **Biochim Biophys Res Commun** 2000; 276(2):461-465.
- 27- Holandino C, Zanetti L R M, Fernandes T, Homsani F et al. Multicenter project Brazil-Italy: physical chemical analysis of Zincum metallicum and lactose in dynamized mixtures. Annals of the XXX GIRI meeting, Amsterdam, 8-10th September 2016. **International J High Dilution Res. In press**.
- 28- Caron V, Willart J F, Lefort R, et al. Solid state amorphization kinetic of alpha lactose upon mechanical milling. **Carbohydr Res** 2011; 346(16): 2622-2628.
- 29- Das S, Das J, Samadder A, et al. Biosynthesized silver particles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells. **Colloids Surf B Biointerfaces** 2013; 101(1):325-336.
- 30- Vijayaraj R, Kumar K N, Mani P, et al. Green synthesis of silver nanoparticles from ethanolic seed extract of *Acranythes aspera* (Linn.) and its anti-inflammatory activities. **Internat Journal of Pharma & Therap** 2016; 7(1):42-48.
- 31- Paul B K, Kar S, Bandyopadhyay P, et al. Significant enhancement of dielectric and conducting properties of electroactive polymer polyvinylidene fluoride films: An innovative use of *Ferrum metallicum* at different concentrations. **Indian Journal of Research in Homoeop** 2016; 10(1): 52-58.
- 32- Boiron J, Cier A, Vlning C. Effets de quelques facteurs physiques sur l'activité pharmacologique de dilutions infinitésimales. **Annales Homeopathiques Françaises** 1968 ; 10 :187-1986.
- 33- Milgrom L R, King K R, Lee J, et al. On the investigation of homeopathic potencies using low resolution NMR T2 relaxation times: an experimental survey of the work by Roland Conte et al. **Br Homeop J** 2001; 90(1):5-13.

- 34- Scherr, C, Baumgartner S, Spranger, J, et al. Effects of potentised substances on growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Forsch. Komplementmed** 2006; 13(5):298-306.
- 35- Bellavite P, Signorini A, Marzotto M, et al. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy** 2015; 104(2):139-160.
- 36- Marzotto M, Olioso D, Brizzi M, et al. Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of *Gelsemium sempervirens*. **BMC Complement Altern Med** 2014; 104(14) doi: 10.1186/1472-6882-14-104.
- 37- Wynn T A, Chawla A, Pollard, J W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature** 2013; 496:445-455 doi:10.1038/nature12034.
- 38- Ginhoux F, Schultze J L, Murray P J, et al. New insights into the multidimensional concept macrophage ontogeny, activation and function. **Nature Immunology** 2016; 17(1):34-40.
- 39- Amit I, Winter D R, Jung S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. **Nature Immunology** 2016; 17(1):18-25.
- 40- Glass C K, Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. **Nature Immunology** 2016; 17(1):26-33.
- 41- Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature Immunology** 2016; 17(1):9-17.
- 42- Riley J A, Heiter, B J, Bourbeau P P. Comparative Recovery of Microorganisms from BacT/ALERT Plastic and Glass FA and FN Blood Culture Bottles. **Journal of Clinical Microbiology** 2005; 43(7):3244-3246.
- 43- Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environ Sci Pollut Res Int** 2009; 16(3):278-286.
- 44- Bach C, Dauchya X, Severin I, et al. Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity. **Food Chemistry** 2013; 139(1-4):672-680.
- 45- Alves R M V, Jaime S B M, Gonçalves M P, Suzuki P W. Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. **Rev. Cienc. Farm. Básica Aplic** 2008; 29(2):169-180.
- 46- Jager T, Scherr C, Wolf U, et al. Investigation of arsenic-stressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a bioassay in homeopathic research. **Scientific World Journal** 2011; 11:568-583.
- 47- Damin S, Alves L F A, Bonini A K, et al. *In vitro* assay on homeopathic solutions on *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorok (Ascomycota: Clavicipitaceae) **Arq. Inst. Biol. São Paulo** 2015; 82:1-8.
- 48- Santana R F, Dalboni C L, Nascimento F K et al. Avaliação de co-culturas de macrófagos e *Leishmania (L.) Amazonensis* após o tratamento de preparações homeopáticas. [Tese] de Doutorado. **Universidade Paulista**. São Paulo; 2016.
- 49- Paulino N, Paulino A S, Diniz S N, et al. Evaluation of the anti-inflammatory action of curcumin analog (DM1): Effect on iNOS and COX-2 gene expression and autophagy pathways. **Bioorg. Med. Chem** 2016; 24(8):1927–1935.
- 50- Il'in D A, Arkhipov S A, Shkurupy V A. *In Vitro* Study of Cytophysiological Characteristics of Multinuclear Macrophages from Intact and BCG-Infected Mice. **Microbiology and Immunology** 2016; 160(5): 668-671.
- 51- Zanganech S, Hutter G, Spitler R, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing- pro inflammatory macrophage polarization in

tumour tissues. *Nature nanotechnology* 2016; 1-10. DOI: 10.1038/NNANO.2016.168.

- 52- Elia V, Baiano S, Dura I, *et al.* Permanent physico-Chemical properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. **Homeopathy** 2004; 93:144-150.
- 53- Elia V, Napoli E, Germano R. The memory of water: an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. **Homeopathy** 2007; 96:163-169.
- 54- Elia V, Ausanio G, Gentile F, *et al.* Experimental evidence of stable water nanostructures in extremely dilute solutions, at standard pressure and temperature. **Homeopathy** 2014; 103:44-50.
- 55- Edacheril R S. An evaluation of Avogadro's number in the light of HRTEM and EDS studies of high dilutions of *Ferrum metallicum* 6c, 30c, 200c, 1M, 10M and 50M. **Intern Journal High Dilution Research** 2015; 14(3):3-9.
- 56- Bell I R, Muralidharan S, Schwartz G E. Nanoparticle characterization of traditional homeopathically - Manufactured *Gelsemium sempervirens* medicines and placebo controls. **Nanomedicine & Biotherapeutic discovery** 2015; 5:1-13.
- 57- Marzotto M, Olioso D, Bonafini C, Bellavite P. 2° International Homeopathy Research Conference. 2015, Riliane Turati Rome Italy. Differential dose-dependent effects of arsenic in pro- and anti- inflammatory cytokines. **Cutting Edge Research in Homeopathy**: Fri 5 june. p. 20.
- 58- Iye E C, Couchman I M S, Reddy L. Therapeutic effect of *Arsenicum album* on leukocytes. **Rev. Int. j. Mol. Sci** 2012; 13(3):3979-3987.
- 59- Demangeat J L. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. **Homeopathy** 2015; 104:101-115.
- 60- Cartwright S J. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. **Homeopathy** 2016; 105(1):1-11.
- 61- Smith C W. Electromagnetic and magnetic vector potential bio-information and water. **Homeopathy** 2015; 104:301-304.
- 62- Chaplin F M. The memory of water: an overview. **Homeopathy** 2007; 96: 143-150.
- 63- Thomas T Y. From high dilutions to digital biology: The physical nature of the biological signal. **Homeopathy** 2015; 104: 295-300.
- 64- Zhang Z, Liu H, Zhou H, *et al.* A facile route to core-shell nanoparticulate formation of arsenic trioxide for effective solid tumor treatment. **Nanoescale** 2016; 8(7):4373-4380.
- 65- Schulte J. Publications on experimental physical methods to investigate ultra high dilutions an assessment on quality. **Homeopathy** 2015; 104:311-315.
- 66- Schulte J. Experimental physical methods and theories-then and now. **Homeopathy** 2015; 104:305-310.
- 67- Schulte J, Endler C P. Update on preliminary elements of a theory of ultra high dilutions. **Homeopathy** 2015; 104:337-342.
- 68- Schulte J. Observations on entanglement, non-locality and ultra high dilutions. **Homeopathy** 2015; 104:316-321.

ANEXO



Pós-Graduação Stricto Sensu
 Mestrado e Doutorado - Campus Indianópolis
 Rua Dr. Bacelar, 1212 - 4º Andar - Vila Clementino
 São Paulo - SP - CEP: 04026-002
 Site: www.unip.br

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, não ter utilizado procedimentos com animais no desenvolvimento da Pesquisa para a Tese do Programa de Mestrado em *Patologia Ambiental e Experimental* da Universidade Paulista – UNIP.

Aluno: Luciane Costa Dalboni

RA: 8150092

Orientador: Leoni Villano Bonamin

São Paulo, 03 de novembro de 2016.

Assinatura do(a) Aluno(a)

Assinatura do(a) Orientador(a)