

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO À TOXICIDADE DO CLORETO DE CHUMBO POR ISOTERÁPICO EM MODELO DE *Artemia salina***

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.

**SUHAM NOWROOZ MOHAMMAD**

**SÃO PAULO**

**2020**

**SUHAM NOWROOZ MOHAMMAD**

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO À TOXICIDADE DO CLORETO DE CHUMBO POR ISOTERÁPICO EM MODELO DE *Artemia salina***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP

**BANCA EXAMINADORA:**

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

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Martha Bernardi  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Giovani Bravin Peres  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cideli Coelho  
Universidade de Santo Amaro - UNISA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Marilda e Abdul, por me criarem com tanto amor e respeito e me incentivarem sempre a ser melhor e a alcançar meus objetivos, e ao Marcel, pelo companheirismo, amizade e suporte em toda essa jornada e há tanto anos, obrigada por se doar tanto por meus sonhos. Vocês viveram todas as etapas importantes da minha vida, basta eu pensar em vocês para a vida fazer sentido, obrigada por estarem sempre aqui por mim.

Agradeço à Marcia, por me acolher e cuidar de mim como uma filha, aguentando meus humores, me apoando e amando. Aos meus irmãos, Heyam, Amir e Samir, por dividirem a vida comigo. E à minha filha (canina) Kamala, e todos os meus amores caninos. Vocês me influenciam de uma maneira que apenas quem conhece e sente saberá.

Aos meus amigos, Francisco, Juliana e Sonia. Eu sei que muito do que eu falei e falo não faz sentido para vocês, mas obrigada por escutarem mesmo assim, vocês enchem meu coração de amor.

Aos meus colegas de mestrado, Andreia, Ednar, Adalberto, Mirian e Sandra, vocês são incríveis e foi um prazer dividir essa experiência com vocês.

Às pessoas que me ajudaram neste projeto, professora Ivana, professor Giovani, ao Jefferson, à Michelle, ao Wilton e toda a equipe UNIP, agradeço de coração pela ajuda, dedicação e disponibilidade.

E por último, mas não menos importante, às minhas orientadoras, Martha e Leoni, por me acolherem, respeitarem meu tempo, compartilharem seus conhecimentos e experiências e por fazerem parte de algo tão importante quanto isso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Foi uma honra participar do programa e receber esse apoio.

Todos vocês marcaram minha história para sempre.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Sobre homeopatia e seus conceitos.....	14
1.2. Sobre a <i>Artemia salina</i> .....	18
1.3. Sobre as fases da lua.....	22
1.4. Sobre os metais pesados .....	25
2. OBJETIVOS.....	30
3. JUSTIFICATIVAS .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1. Preparação das matrizes dos isoterápicos .....	32
4.2. Preparo dos medicamentos.....	32
4.3. Codificação dos frascos .....	33
4.4. Eclosão de cistos de <i>Artemia salina</i> em função das fases da lua .....	35
4.4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos .....	35
4.4.2. Preparação da água marinha artificial.....	37
4.4.3. Preparação de alimento para <i>Artemia salina</i> .....	37
4.4.4. Definição de concentração letal 10% (CL 10) .....	38
4.4.5. Preparo das placas .....	39
4.4.6. Análise das placas .....	40
4.5. Mobilidade .....	41
4.5.1. Escolha das placas .....	41
4.5.2. Análise .....	41
4.6. Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) .....	41
4.6.1. Escolha das placas .....	42
4.6.2. Preparo das amostras .....	42
4.6.3. Análise .....	43
4.7. Método Cartwright .....	44

4.7.1. Escolha das placas .....	45
4.7.2. Preparo das amostras .....	45
4.7.3. Preparo dos corantes .....	45
4.7.4. Definicação do pico de absorbância .....	46
4.7.5. Preparo e leitura das cubetas .....	47
4.8. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS .....	50
5.1. Análise da eclosão dos cistos em função da fase da lua .....	50
5.2. Análise da mobilidade dos náuplios por Image J.....	52
5.3. Análise físico-química da água por MEV-EDS .....	55
5.4. Análise de espectrometria pelo método Cartwright .....	56
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO .....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Abdul e Marilda, e ao Marcel. Vocês, sem dúvida, fazem parte de mim e eu não seria quem sou hoje e não alcançaria o que alcancei sem o amor, suporte e influência de vocês. Obrigada pelo amor incondicional.

“Nem todos que procuram estão perdidos.”

*J. R. R. Tolkien*

## RESUMO

**Introdução:** O presente modelo experimental foi estabelecido baseado nas seguintes premissas: 1- A poluição química é uma das principais causas de intoxicações no mundo, 2- A facilidade de manuseio da *Artemia salina* aliada ao fato de ser um bom biomarcador toxicológico, 3- a isoterapia pode ser um recurso alternativo no tratamento de intoxicações. **Objetivo:** Verificar a proteção da *Artemia salina* ao cloreto de chumbo pela introdução de isoterápico na água. **Metodologia:** Os cistos de *Artemia salina* foram expostos a água salina contendo 0,04% (CL 10 ou concentração letal 10%, previamente determinada a partir do cálculo de viabilidade de amostras intoxicadas com diversas concentrações de  $PbCl_2$ ) de cloreto de chumbo em placas de cultura de 96 poços. No total, foram utilizadas 36 placas, as repetições experimentais foram realizadas ao longo de um mês, para observar a eficiência dos tratamentos ( $PbCl_2$  6cH, 30cH e 200cH). As variações de resultados entre as diferentes fases da lua foram também observadas, para controle de eventuais vieses derivados de tais variações ambientais. O registro da eclosão dos cistos foi feito por meio de um microscópio digital (aumento 1000x) para identificar a porcentagem de eclosão, a viabilidade dos náuplios nascidos e sua atividade geral. Análises físico-químicas da água foram realizadas por MEV-EDS de micro-sedimentos sólidos em suspensão e pela avaliação do comportamento dipolo da água utilizando corantes solvatocrônicos como sondas. **Resultados e discussão:** A intoxicação aumentou a taxa de eclosão dos cistos, mas houve redução significativa ( $p = 0,00003$ ) entre os cistos tratados com água ou preparações sucussionadas, comparando-se com aqueles tratados apenas com água não submetida à agitação (controle). Esse efeito foi especialmente evidente na lua cheia. Náuplios intoxicados apresentaram aumento na atividade geral ( $p<0,001$ ). Não se verificou a presença de chumbo total nos sedimentos, sugerindo ausência de efeito quelante. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada na reação aos corantes solvatocrônicos. **Conclusão:** A intoxicação dos cistos induz aumento na taxa de eclosão dos cistos e na atividade geral dos náuplios. A redução na taxa de eclosão após os tratamentos foi considerada como efeito protetor atribuído à agitação da água *per se*. Tal efeito foi mais evidente na lua cheia, quando há naturalmente o pico de eclosões. Sugere-se que nanobolhas possam ser um fator importante no *clearance*, embora não haja evidências de efeito quelante. As diluições isoterápicas estudadas não mostraram efeitos específicos, o que é corroborado pela ausência de efeitos sobre os corantes solvatocrônicos, considerados como marcadores de atividade biológica desses produtos.

**Palavras-chave:** eco-toxicologia, chumbo, microcrustáceo, homeopatia

## ABSTRACT

**Introduction:** This experimental model was established based on the following premises: 1- Chemical pollution is one of the main causes of poisoning in the world, 2- The easy-handling of *Artemia salina* combined with the fact that it is a good toxicological biomarker, 3- isotherapy can be an alternative resource in the treatment of intoxications.

**Objective:** To verify the possible protection of *Artemia salina* to lead chloride by the introduction of isotherapeutic preparations into water. **Methodology:** *Artemia salina* cysts were exposed to sea water containing 0.04% (CL 10 or 10% lethal concentration, previously determined from the viability calculation of samples intoxicated with different concentrations of  $PbCl_2$ ) of lead chloride in 96-well culture plates. Thirty-six plates were used, the experimental repetitions were performed over a month, to observe the possible effects of the treatments ( $PbCl_2$  6cH, 30cH and 200cH). Variations among the different phases of the moon were also observed, to control biases from this important environmental variation. The cysts hatched were recorded using a digital microscope (1000x magnification) to identify the hatch percentage, the viability of the born nauplii and their general activity. Physico-chemical analyzes of the water were performed by SEM-EDS of suspended solid micro-sediments and by the evaluation of dipole behavior of water using solvatochromic dyes as probes. **Results and discussion:** Intoxication increased the rate of cysts hatching, but there was significant reduction ( $p = 0.00003$ ) among cysts treated with water or succussed preparations, compared with those treated only with water not subjected to agitation (control). This effect was especially evident on the full moon. Intoxicated nauplii showed increase in general activity ( $p < 0.001$ ). There was no lead in the sediments, suggesting the absence of a chelating effect. No significant difference between groups was observed in relation to solvatochromic dyes interaction.

**Conclusion:** Intoxication of cysts induces increase in the hatching rate and in the general activity of nauplii. The reduction of hatching rate after the treatments was considered as a protective effect attributed to the agitation of the water *per se*. This effect was more evident at the full moon when there is a peak of hatches. It is suggested that nanobubbles may be an important factor to the *clearance*, although there is no evidence of chelating effect. The studied isotherapeutic dilutions did not show specific effects, which is corroborated by the absence of effects on solvatochromic dyes, considered as markers of biological activity of these products.

**Keywords:** eco-toxicology, lead, microcrustacean, homeopathy.

## **LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

CL 10 – Concentração letal 10%

PbCl<sub>2</sub> – Cloreto de chumbo

cH – Centesimal Hahnemanniana

x – Vezes

OMS – Organização Mundial da Saúde

mm – Milímetro

UV – Radiação Ultravioleta

Pb – Chumbo

u.m.a. – Unidade de massa atômica

µg – Micrograma

L – Litro

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

M – Molar

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

nº – Número

µl – Microlitro

H<sub>2</sub>O – Água

g – Grama

mg – Miligrama

ml – Mililitro

AVI – Audio Video Interleave

rpm – Rotação por minuto

µm – Micrômetro

nm – nanômetro

µM – Micromolar

abs. – Absorbância

ANOVA – Análise de Variância

α – Alfa

v – Versão

± – Mais ou menos

η – Eta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Preparo do medicamento homeopático.

**Figura 2.** Diferentes estágios da *Artemia salina*, desde a fase de cisto até a fase adulta. (A) cisto hidratado, (B) cisto em ruptura, (C) estágio guarda-chuva, (D, E, F) fase naupliar, (G) fase juvenil, (H) fase adulta.

**Figura 3.** Imagem ilustrativa dos órgãos sexuais da *Artemia salina*. Em (A) ovisaco de fêmea da espécie *Artemia salina* e (B) pênis e abdômen de exemplar macho.

**Figura 4.** Acasalamento da espécie *Artemia salina*. (A) macho (abaixo) e fêmea (acima) se acasalando. (B) detalhe do ovissacro da fêmea e da antena do macho presa em toda a estrutura. (C) náuplios dentro do ovissacro pronto para serem liberados.

**Figura 5.** Composição dos cistos de *Artemia salina*. (A) estruturas presentes na concha dos cistos, como a trealose, as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) e as chaperonas moleculares. E de (B) possíveis estresses que esse cisto pode sofrer, como calor, frio, radiação UV, oxidação, anoxia e dessecação.

**Figura 6.** Lua em movimento de translação circular em volta da Terra. Movimento de rotação (A) da Terra sob influência da luz proveniente do Sol (B) enquanto a Lua faz seu movimento de rotação sob seu próprio eixo e o movimento de translação sob a Terra.

**Figura 7.** Posição relativa Sol-Lua-Terra, para cada fase da lua. Sendo elas (A) lua nova, (B) lua cheia e (C) lua crescente ou minguante.

**Figura 8.** A toxicocinética da intoxicação por chumbo.

**Figura 9.** Estresse oxidativo proveniente da exposição ao chumbo e sua manifestação em vários órgãos e moléculas.

**Figura 10.** Processo de contaminação do chumbo em ambientes aquáticos.

**Figura 11.** Desenho experimental padronizado de todas as placas de 96 poços utilizadas no experimento: em “tratamentos” foi colocado cada um dos tratamentos utilizados no experimento ( $PbCl_2$  6cH,  $PbCl_2$  30cH,  $PbCl_2$  200cH, *Ethilicum* 1cH, fileiras de A a D), em “controles” estavam os poços desafiados e tratados com água purificada estéril (grupo desafiado, fileira E) e os poços não desafiados e não tratados (grupo branco, fileira F), em “poços de isolamento”

não foi inserido nada, esses poços serviram apenas para isolar as amostras dos poços H das demais amostras (fileira G), e em “H<sub>2</sub>O dinamizada” estavam os poços desafiados e tratados com água dinamizada (fileira H).

**Figura 12.** Etapas do experimento de análise de eclosão de cistos de *Artemia salina*.

**Figura 13.** Placa de 6 poços com lamínulas metalizadas e os respectivos sedimentos, em triplicata, para análise em MEV-EDS.

**Figura 14.** Imagem de gotícula gerada a partir de amostra de água tratada com PbCl<sub>2</sub> 6cH. Imagem ampliada 20 vezes e depositada sobre lamínula metalizada.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Tipo de ocorrência do Pb, fórmula química e produtos de solubilidade dos minerais e a biodisponibilidade

**Tabela 2.** Resultado de eclosão de diversas concentrações de cloreto de chumbo para a determinação de concentração letal 10%.

**Tabela 3.** Corante utilizados para a análise de espectroscopia pelo método Cartwright.

**Tabela 4.** Principais elementos encontrados na placa 3 através de EDS (porcentagem de átomos pela área analisada). Média dos valores em triplicata.

**Tabela 5.** Principais elementos encontrados na placa 36 através de EDS (porcentagem de átomos pela área analisada). Média dos valores em triplicata.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sobre homeopatia e seus conceitos

O conceito da homeopatia baseia-se no uso de doses extremamente fracionadas e diluídas, submetidas à agitação ritmada, as quais são capazes de manter a informação da substância de origem de alguma forma registrada no solvente, para permitir que seus efeitos terapêuticos sejam preservados. Proposta por Christian Friederich Samuel Hahnemann no final do século XVIII, a prática homeopática é amplamente adotada em todo o mundo, a despeito das polêmicas que surgem na comunidade científica. Contudo, dados recentes de pesquisa básica tem permitindo desvendar alguns aspectos relacionados ao seu mecanismo de ação (1).

A homeopatia é reconhecida como especialidade médica desde 1980 pelo Conselho Federal de Medicina sendo disponibilizada em alguns ambulatórios e postos de saúde da rede pública desde 1985; entretanto ela está inserida apenas como disciplina optativa em algumas faculdades de medicina do Brasil e muitos profissionais da saúde ainda apresentam resistência a tal prática (2). Por conta disto e de outros fatores, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem incentivando projetos que visam incrementar essa ciência, sobre sua eficácia e mecanismos de ação, a fim de incluir esse tratamento aos sistemas públicos de saúde mundiais de forma coadjuvante aos tratamentos clássicos. No Brasil, o Ministério da Saúde tem um projeto chamado de “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde” com o intuito de incentivar e apoiar projetos de medicina alternativa e pesquisa na área (2).

A fenomenologia da atividade biológica observada na aplicação de medicamentos homeopáticos, na clínica ou no laboratório, mostra certa facilitação do organismo estimulado em reestabelecer a homeostase (3). Na homeopatia, os medicamentos preparados de acordo com os métodos descritos por Hahnemann (onde a substância original sofre agitação rítmica e diversas diluições) podem ser testados tanto em pacientes humanos e animais domésticos como em sistemas biológicos que não são influenciados psicologicamente, como plantas, invertebrados, cultura de células e outros (4).

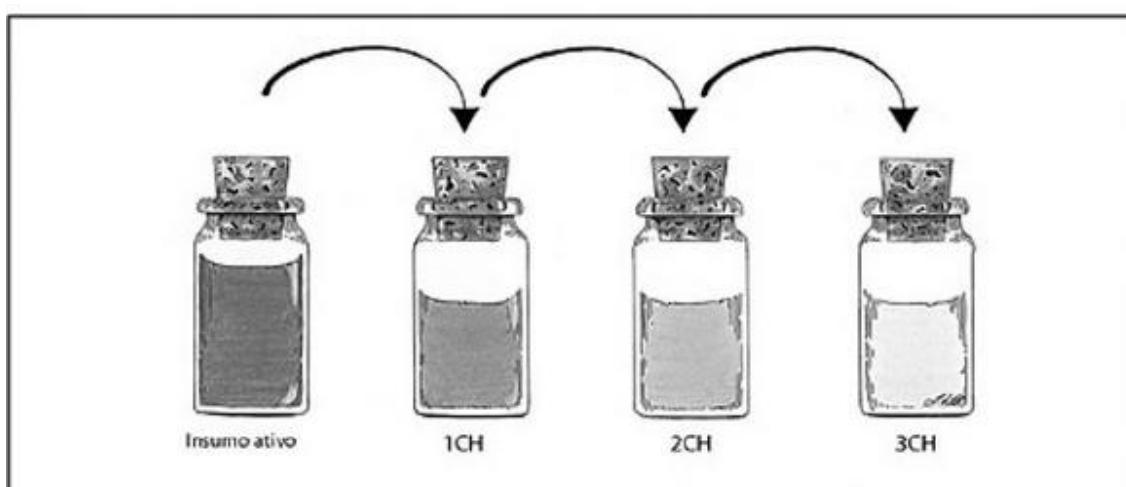
Devido à ultra diluição usada nas preparações homeopáticas, em algumas potências apenas o solvente (a água ou álcool) tem papel de transmitir a informação presente naquela preparação. Uma vez que já não há mais soluto presente naquele ambiente, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno não são totalmente elucidados, mas sabe-se que isso acontece de fato, graças a estudos realizados “em cego” em animais e vegetais. (5, 6).

É importante entender que o termo homeopatia e isoterapia traduzem tratamentos diferentes. Na homeopatia, o tratamento se dá pelo sintoma semelhante, já na isoterapia o tratamento se dá pela mesma causa, independente da sua natureza orgânica ou inorgânica. A homeopatia baseia-se no princípio de semelhança entre todos os sintomas dos doentes e os sintomas detectados nas experimentações patogenéticas de indivíduos sadios. Por outro lado, a isoterapia tem como princípio a igualdade, utilizando o próprio agente etiológico para promover a cura ou redução de danos ao indivíduo (7). Preparações isoterápicas também são usadas em situações de intoxicação de seres vivos, inclusive com metais pesados. A partir do conceito de tratar o indivíduo através da mesma causa da doença, surgiu-se o termo nosódio, criado por C. Hering, utilizado para designar medicamentos produzidos a partir de produtos patológicos vegetais e animais (7, 8).

A homeopatia foi desenvolvida tendo como base o princípio de similitude, onde qualquer substância capaz de provocar certos sintomas em um indivíduo sadio e sensível, em doses adequadas, é capaz de curar um enfermo que apresente quadro clínico semelhante. Para isto utiliza-se diluições infinitesimais e potencializadas por fortes agitações, que obedece a uma progressão geométrica que promove a diminuição de sua concentração química e o surgimento de mudanças na organização dinâmica do líquido, evidenciadas por mudanças nas propriedades físico-químicas do solvente, que estimulam a reação do organismo do indivíduo tratado em direção à cura (9).

Na preparação do medicamento homeopático se utiliza o insumo ativo, que é a droga, fármaco ou forma farmacêutica utilizada para a preparação do medicamento, e o insumo inerte, que é a água purificada ou etanol e serve como substância complementar na preparação desses medicamentos e tem como função diluir o medicamento, solubilizar os insumos ativos, servir de veículo da

informação medicamentosa e facilitar a administração do medicamento. A partir disto, adiciona-se uma parte do insumo ativo e 99 partes do insumo inerte, que é posteriormente sucussionada e traduz a primeira dinamização centesimal hahnemanniana (1cH). Para se obter a segunda dinamização centesimal hahnemanniana (2cH) utiliza-se uma parte da 1cH mais 99 partes do insumo inerte e posterior sucussão. As demais potências são realizadas da mesma maneira e progressivamente, assim como mostra a figura 1 (9 - 12).



**Figura 1. Preparo do medicamento homeopático.** Fonte: Fontes, 2013 (9).

Na isoterapia, o preparo do medicamento segue as mesmas recomendações e o que muda é o insumo ativo, cujo a origem pode ser endógeno ou exógena e podem ser autoisoterápicos, onde o insumo ativo é oriundo do próprio paciente (endógeno) e só é destinado a ele, ou heteroisoterápicos, cujo insumo ativo é externo do paciente (enxógeno) e que o sensibiliza (12).

Existem diversos estudos sobre os efeitos dos isoterápicos sobre os sistemas biológicos e os resultados são diversos. Um estudo feito por Almeida et al. (2006) sobre o efeito do *Plumbum metallicum* 30cH na reparação óssea em mandíbulas de ratos demonstrou que tal medicamento favoreceu a reparação de defeitos ósseos dos animais testados (13). Em contrapartida, Padilha et al. (2011) ao tratarem com *Plumbum metallicum* 15cH trabalhadores expostos ao

chumbo, não observaram redução significativa do chumbo sérico nos mesmos (14). Um estudo feito por Bagot (2015) ao longo de 15 anos, onde foi administrado a diversos pacientes submetidos à quimioterapia, terapia hormonal e outras terapias direcionadas ao tratamento de câncer, uma dose diária de uma diluição da quimioterapia utilizada. Visto que essas terapias por si só diminuem a qualidade de vida dos pacientes, foi observado que tais heteroisoterápicos reduziram os efeitos colaterais da terapia em que o paciente estava submetido, o que aumentou a qualidade de vida dos pacientes (15).

Além do papel da homeopatia na saúde humana e animal, muito tem se discutido sobre o papel ecológica da homeopatia. Além de agir como eliminador parcial de agentes do meio ambiente, uma grande contribuição da homeopatia é a de devolver ao solo excrementos sem resíduos que propiciem o desenvolvimento natural de insetos e microrganismos, que são responsáveis pela transformação e incorporação da matéria orgânica no solo, o que deixa o solo mais saudável que, por sua vez, produz plantas igualmente saudáveis (16). Além disto, existe a possibilidade de a homeopatia agir como purificador de água através da ação das nanobolhas produzidas no processo de sucussão e que possuem a capacidade de adsorver substâncias presentes no meio aquático (17).

Um método desenvolvido recentemente para verificar padrões de polaridade do solvente em potências homeopáticas em medicamentos diversos é o método Cartwright. Neste método, corantes solvatocrônicos são usados como sondas moleculares de caráter dipolar (as moléculas desses corantes têm marcada polarização positiva e negativa), capazes de interagir com o solventes dipolares por atração de cargas (+) e (-) e mudar de cor na medida em que a polaridade do solvente também muda, quando em contato com potências homeopáticas. Utiliza-se espectroscopia de luz visível para acompanhar mudanças na absorbância dos corantes na presença das potências homeopáticas. Postula-se que as potências influenciam a química supramolecular dos corantes solvatocrônicos, melhorando a agregação ou desagregação do corante (18).

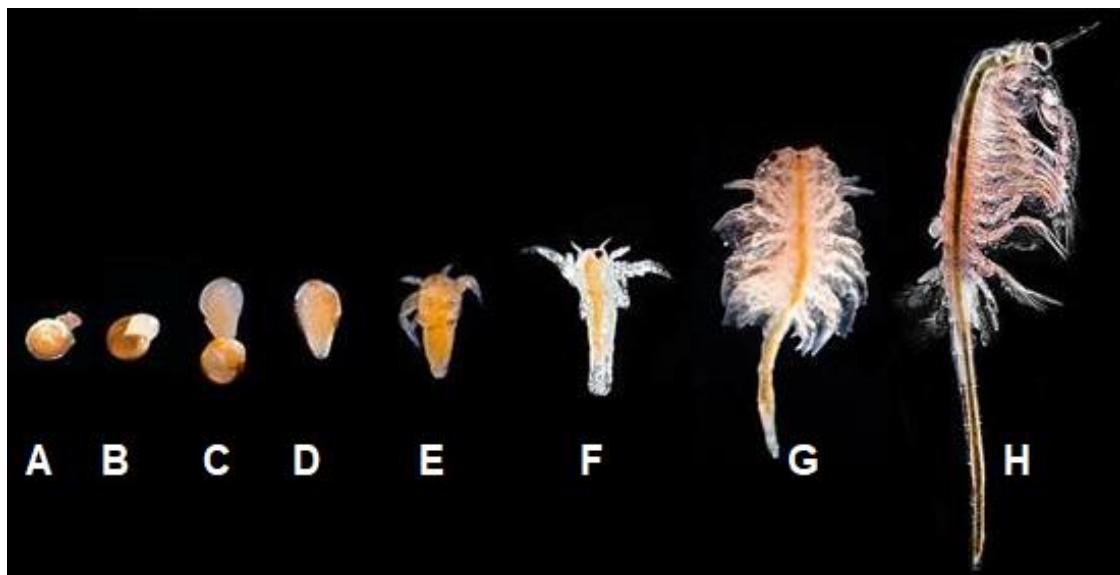
## 1.2. Sobre a *Artemia salina*

A *Artemia salina*, também conhecida como camarão-de-salmoura, é um micro crustáceo, presente em todos os oceanos, braquiópoda e do filo Arthropoda (19).

Devido a sua capacidade de adaptação ambiental, resistência a fatores de estresse, alta fecundidade, ciclo de vida curto, proporções diminutas, pelo fato de serem de fácil aquisição e apresentarem grande homogeneidade entre cistos, a *Artemia salina* é utilizada em diversos estudos eco toxicológicos, como estudos de bioacumulação e liberação de metais pesados em ecossistemas, tais como prata, zinco, cobre e cádmio. Essa espécie é altamente resistente ao cádmio e ao cobre, sendo particularmente um grande acumulador desses elementos (20 - 23).

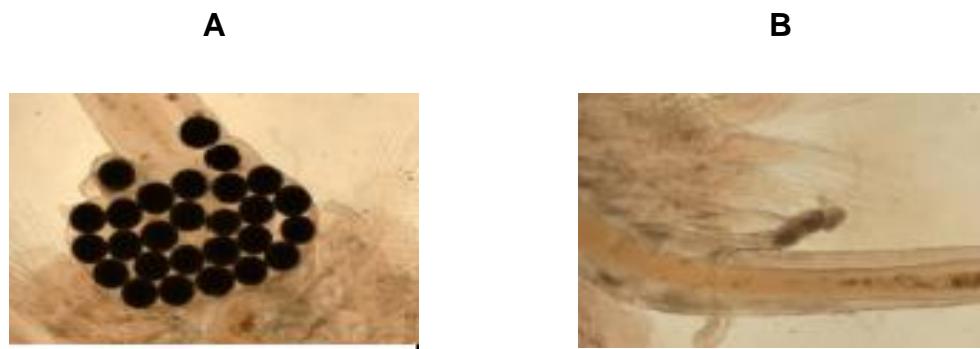
As fases de desenvolvimento desse artrópode primitivo compreendem: cisto, *guarda-chuva*, náuplio, juvenil e adulta. Na fase de cisto que, pode durar até 25 anos, as principais características estruturais se diferem em pré e pós hidratação; na pré-hidratação os cistos apresentam-se como côncavos e na pós-hidratação os cistos estão esféricos. A fase *guarda-chuva* consiste no primeiro estágio pós eclosão, em que o embrião presente no cisto rompe as membranas do mesmo e começa a nadar no meio externo. Essa fase dura de 1 a 8 horas e o animal apresenta pouca atividade muscular. A fase naupiliar da *Artemia salina* pode ser dividida em 5 estágios instar (I – V) e pode durar até 48 horas, é nessa fase em que o animal encontra-se em estágio de larva, se alimenta de nutrientes vindos das reservas embrionárias e, posteriormente, por filtração da água. A fase naupiliar existe até o animal atingir a fase juvenil e, posteriormente, a fase adulta que pode durar de 8 a 15 dias (24).

O ciclo de uma *Artemia salina* dura aproximadamente 21 dias e durante esse período o animal apresenta diferentes tamanhos. Os cistos têm tamanho aproximado de 0,1 mm de largura e 0,45 mm de comprimento, o náuplio apresenta diâmetro médio de 0,2 a 0,3 mm, na fase juvenil a *Artemia salina* tem de 5 a 6 mm e na fase adulta podem atingir até 16 mm. A figura 2 mostra as diferenças anatômica entre as diferentes fases da *Artemia salina* (25, 26).

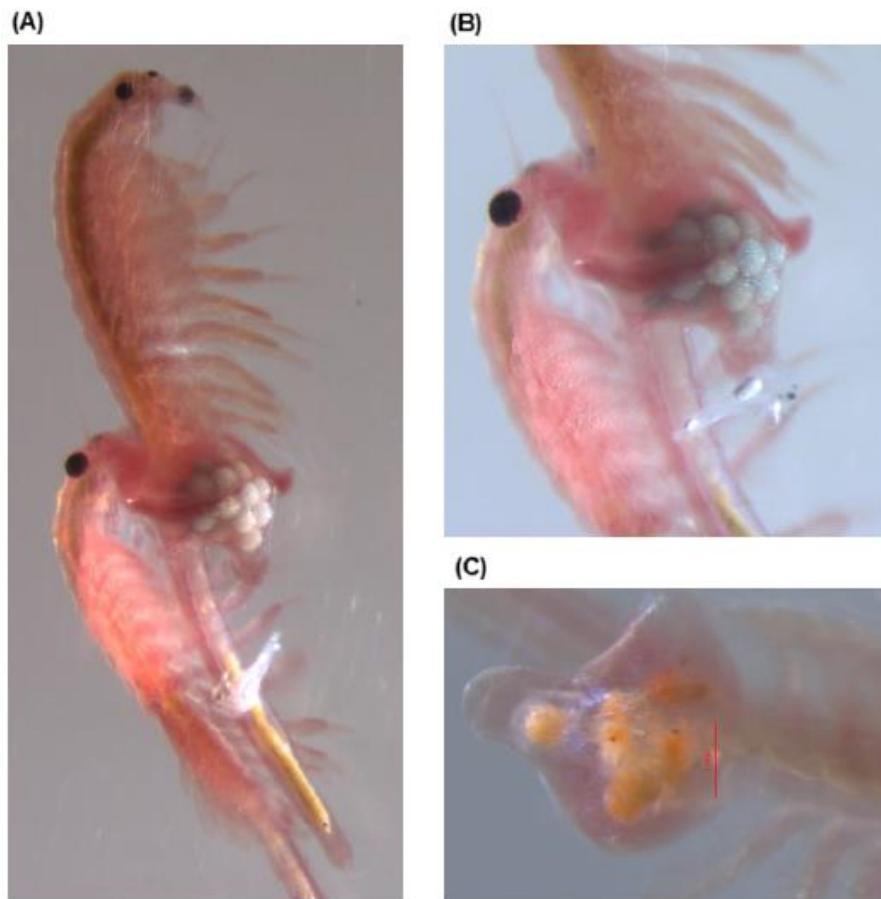


**Figura 2. Diferentes estágios da *Artemia salina*, desde a fase de cisto até a fase adulta.** (A) cisto hidratado, (B) cisto em ruptura, (C) estágio guarda-chuva, (D, E, F) fase naupliar, (G) fase juvenil, (H) fase adulta. Fonte: adaptado de Harzsch *et al.*, 2002 (26).

As principais diferenças entre o macho e a fêmea da espécie *Artemia salina* é a presença do ovissaco (útero externo) na área abdominal das fêmeas e um par de pênis nos machos (27), assim como ilustra a figura 3. Durante a reprodução da *Artemia salina*, que pode ser tanto sexual quanto assexuada, há produção de cerca de 300 cistos ou náuplios em pelo menos 4 dias. A reprodução ocorre quando o macho se aproxima da fêmea e com suas antenas transformadas agarra a mesma, pareando seu pênis no oviduto da fêmea, assim como mostra a figura 4 (27, 28).



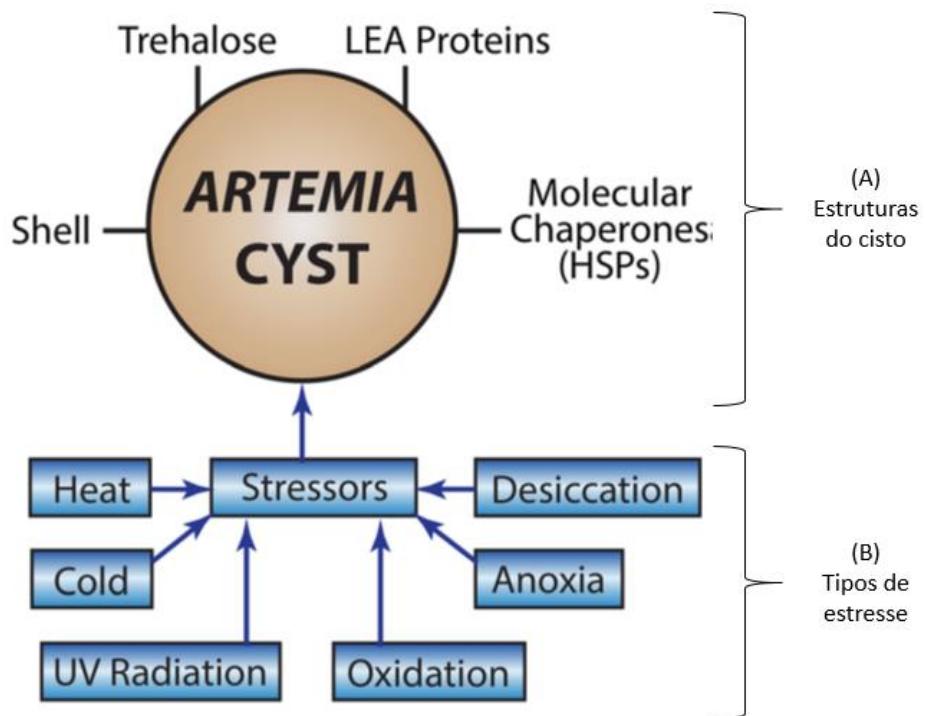
**Figura 3. Imagem ilustrativa dos órgãos sexuais da *Artemia salina*.** Em (A) ovisaco de fêmea da espécie *Artemia salina* e (B) pênis e abdômen de exemplar macho. Fonte: laboratório de organismos aquáticos – UNIP.



**Figura 4. Acasalamento da espécie *Artemia salina*.** (A) macho (abaixo) e fêmea (acima) se acasalando. (B) detalhe do ovissacro da fêmea e da antena do macho presa em toda a estrutura. (C) náuplios dentro do ovissacro pronto para serem liberados. Fonte: Schazter, 2020 (29).

Os cistos de *Artemia salina* podem ser armazenados em ambientes secos e/ou anaeróbicos por no mínimo seis meses, sem necessitar de manutenção constante e sem perder a viabilidade. Uma vez hidratado, o embrião que está dentro do cisto é ativado e rompe as membranas, estágio chamado de “guarda-chuva”, nascendo assim um náuplio livre. É normalmente neste estado que os estudos de toxicidade são realizados (30). Uma das características mais importantes dos cistos de *Artemia salina* é a capacidade deles de entrar em diapausa. Esse é o estado em que o metabolismo dos cistos permanece suprimido e há uma maior tolerância a qualquer fator estressante do meio externo (31).

Os cistos de *Artemia salina* são formados por uma concha rígida, semipermeável, com morfologia adaptada para resistência à radiação UV que confere ao embrião uma primeira linha de defesa. Essa concha é constituída pelo dissacarídeo trealose, que é um dissacarídeo não redutor constituído de duas unidades de glicose. Além deste, também há a presença de proteínas que permitem que o cisto sobreviva por um longo período de dessecação. As chaperonas moleculares têm a função de auxiliar as proteínas recém formadas a assumirem uma configuração apropriada ao desempenho de suas tarefas e evitar a desnaturação irreversível das mesmas durante o estresse (32, 33, 34). Essas estruturas presentes nos cistos trabalham em conjunto e conferem resistência ao mesmo frente a diversos estímulos agressores como temperaturas extremas, radiação, dessecação, anoxia, oxidação e outros. Esse grau de tolerância encontrado nesta espécie é raramente visto em qualquer estágio da história de vida de qualquer outro animal. Entende-se que a *Artemia salina*, ao permanecer em estágio de cisto, está se protegendo de qualquer agente agressor do meio externo, até encontrar condições propícias para uma possível eclosão, assim como ilustrado na figura 5 (34).



**Figura 5. Composição dos cistos de *Artemia salina*.** (A) estruturas presentes na concha dos cistos, como a trealose, as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) e as chaperonas moleculares. E de (B) possíveis estresses que esse cisto pode sofrer, como calor, frio, radiação UV, oxidação, anoxia e dessecação. Fonte: adaptado de MacRae, 2015 (34).

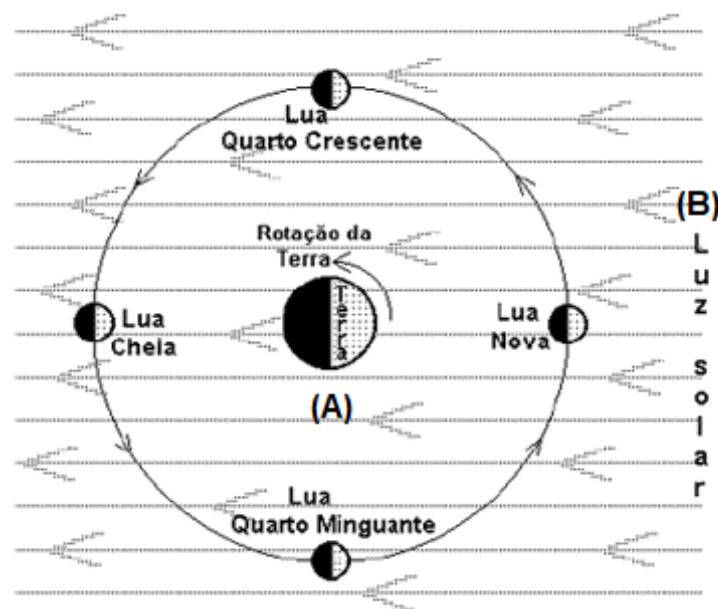
### 1.3. Sobre as fases da lua

A influência das fases da lua sobre os animais, vegetais e grandes massas de água tem sido um assunto discutido há muito tempo, desde sua influência na fisiologia animal e vegetal quanto sua participação no ciclo das marés e na vida de animais aquáticos em geral. Clássicos autores como Aristóteles e Lucílio já falavam sobre uma possível relação entre o ritmo lunar e o tamanho de alguns animais marinhos (35, 36).

Dentre alguns efeitos do ciclo lunar sobre processos biológicos podemos citar a reprodução em dezenas de espécies, fotossensibilidade, migração, emergência, tempo de eclosão e outros. Corbet (1958) realizou um estudo sobre algumas espécies de insetos aquáticos presentes no lago Victoria, um dos grandes lagos africanos, e observou que em espécies como *Povilla adusta* a eclosão é intimamente sincronizada e ocorre logo após a lua cheia, enquanto em

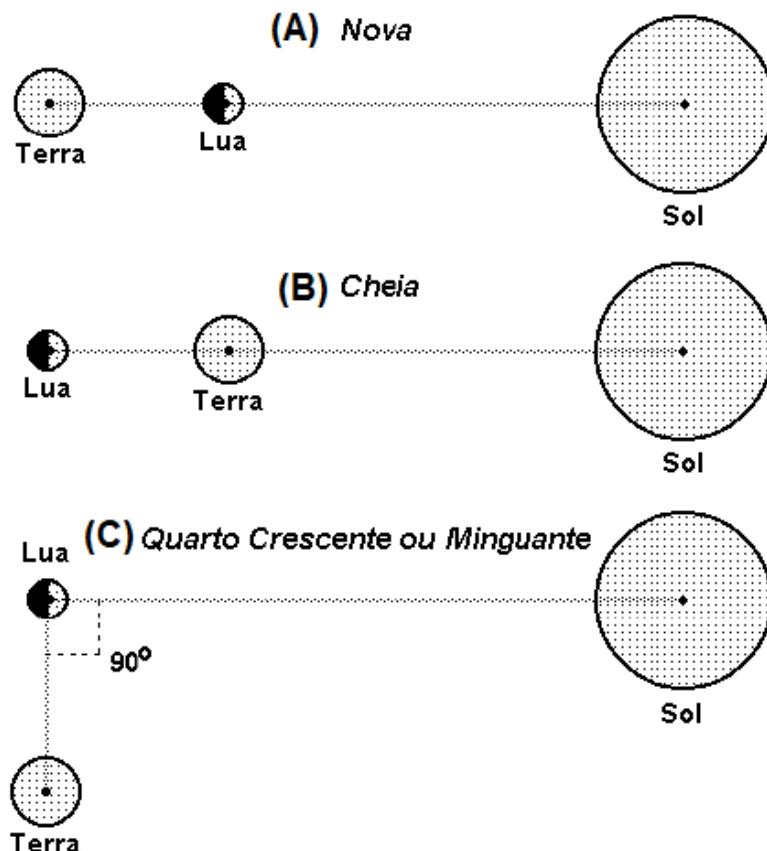
insetos da família Chironomidae, a eclosão ocorre logo após a lua nova. (36 - 38). O ciclo lunar pode influenciar sobre a sobrevivência, alimentação e rotina de diversos animais. Barletta-Bergan (2002) observou que, em alguns riachos de mangue no norte do Brasil, o nível de água aumenta durante a maré alta e diminui durante a maré baixa, mas sempre deixando o local parcialmente inundado, independente da fase da lua. Por conta disto, esses mangues funcionam como berçário durante todo o ciclo lunar, fornecendo comida e proteção para diferentes assembleias de peixes larvais. Outras variáveis ambientais não influenciam significativamente sobre larvas e zooplânctons, mas a composição planctônica está correlacionada positivamente com as fases da lua e suas amplitudes sobre as marés (39 - 41).

Ao longo do ciclo lunar, a lua apresenta quatro principais fases: nova, crescente, cheia e minguante, e nessas fases há variações de intensidade de luz do sol refletida para a superfície terrestre devido ao movimento de translação circular (figura 6) (42, 43).



**Figura 6. Lua em movimento de translação circular em volta da Terra.** Movimento de rotação (A) da Terra sob influência da luz proveniente do Sol (B) enquanto a Lua faz seu movimento de rotação sob seu próprio eixo e o movimento de translação sob a Terra. Fonte: Adaptado de Silveira, 2001 (43).

Esse movimento de translação e rotação confere para cada fase lunar uma posição relativa Sol-Lua-Terra, que está associada a uma posição específica da Lua em sua órbita, assim como mostra a figura 7 (43, 44).



**Figura 7. Posição relativa Sol-Lua-Terra, para cada fase da lua.** Sendo elas (A) lua nova, (B) lua cheia e (C) lua crescente ou minguante. Fonte: Adaptado de Silveira, 2001 (44).

Silveira (2003) apresenta os principais mecanismos responsáveis pelas marés e a dedução matemática que explica o fenômeno como uma relação conjunta das forças gravitacionais do Sol, da Lua e da Terra. Desta forma, as marés dependem dessas posições e que cada fase lunar influencia na observação de marés mais fortes e mais fracas, e por consequência, na vida dos animais marinhos (45, 46).

#### 1.4. Sobre os metais pesados

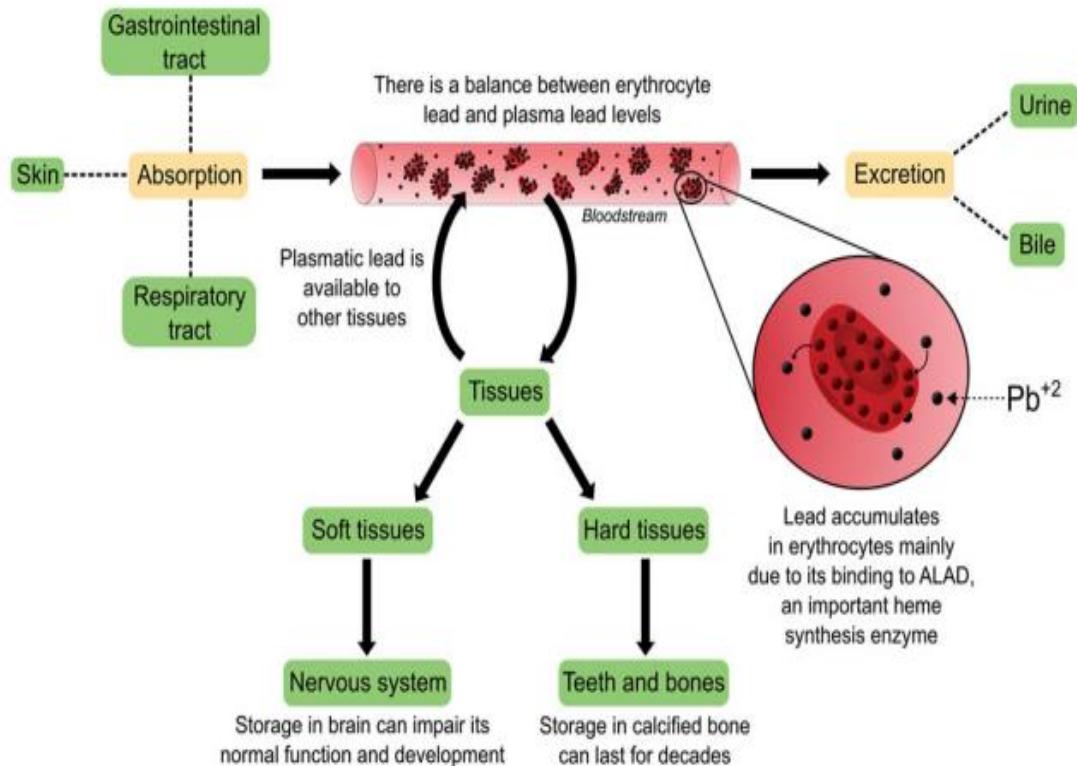
A poluição por metais pesados é uma grande preocupação ambiental, principalmente em países industrializados. Por conta disso, metais pesados tais como chumbo, mercúrio e arsênico são alvos de diversos estudos (47 - 50).

O chumbo é um elemento químico de símbolo Pb (do latim *plumbum*) pertencente ao grupo 14 da classificação periódica dos elementos químicos, em temperatura ambiente encontra-se em estado sólido, massa igual a 207,2 u.m.a. (unidade de massa atômica) e número atômico 82, que confere a este metal o número atômico mais elevado de todos os elementos estáveis. É um metal pesado, tóxico maleável e pobre condutor elétrico. Sua utilização mais comum é em construção civil, baterias de ácido, ligas metálicas, cabos elétricos, munições, soldas, fusíveis, materiais de tipografia e outros (50, 51). Por ser um metal muito difundido na natureza e fácil de ser extraído, o chumbo é utilizado pela humanidade há 7.000 anos e continua sendo até atualmente. Por conta da sua contaminação, a reciclagem e uso consciente deste elemento devem ser feitos criteriosamente (52).

O chumbo é um dos metais pesados mais comuns no meio ambiente, principalmente por conta de sua distribuição industrial e presença em minérios. Os indivíduos, ao serem expostos ao chumbo, têm como principal rota de exposição a via respiratória e gastrointestinal e sua toxicidade afeta principalmente o sistema nervoso e hematopoiético, podendo causar diversos efeitos até mesmo câncer (52, 53). Esse metal não sofre biotransformação, logo, é complexado por macromoléculas e diretamente absorvido, distribuído e parcialmente excretado, provocando intoxicação crônica (54).

O chumbo, ao intoxicar o indivíduo por via respiratória e/ou gastrointestinal, atinge a corrente sanguínea e se associa aos eritrócitos, essa associação permite um equilíbrio entre esse chumbo e o chumbo plasmático. Depois de atingir os tecidos duros como ossos e dentes, o chumbo permanece armazenado por muito tempo e não somente tecidos duros possuem essa capacidade de armazenamento, tecidos moles como rim, fígado, pulmão e cérebro também podem armazená-lo por décadas. No sistema nervoso central a intoxicação por chumbo se dá após danos na barreira hematoencefálica, o que pode prejudicar seu desenvolvimento. A excreção do chumbo acontece por meio

das fezes e da urina. Na figura 8, pode-se observar como ocorre esse processo (55).



**Figura 8. A toxicocinética da intoxicação por chumbo.** Fonte: Souza, 2018 (55).

O chumbo raramente é encontrado na sua forma pura. A tabela 1 apresenta uma relação entre biodisponibilidade e a forma de ocorrência do chumbo, que se refere aos minerais que ele se encontra, o tamanho da partícula, se é livre ou encapsulado, oriundo de minerais ou materiais provenientes da metalurgia (56).

Ocorrência	Fórmula química	$\log K_{PS}$	Biodisponibilidade
<b>Minerais</b>			
Anglesita	$PbSO_4$	7,7	Média
Cerussita	$PbCO_3$	12,8	Alta
Galena	$PbS$	-27,5	Baixa
Fluorpiromorfita	$Pb_3(PO_4)_3F$	-71,6	Baixa
Hidroxipiroromorfita	$Pb_3(PO_4)_3OH$	-76,8	Baixa
Cloropiroromorfita	$Pb_3(PO_4)_3Cl$	-84,4	Baixa
Hinsdalita	$PbAl_3(PO_4)_6(OH)_6SO_4$	-99,1	Baixa
Plumbogumita	$PbAl_3(PO_4)_2(OH)_5H_2O$	-99,3	Baixa
Corkita	$PbFe_3(PO_4)(SO_4)(OH)_6$	-112,6	Baixa
<b>Tamanho de partícula</b>			
Grande			Baixa
Pequena			Alta
<b>Encapsulamento</b>			
Quartzo			Baixa
Material amorfo (escória)			Média
Óxidos de Fe-Pb			Média
PbO			Alta

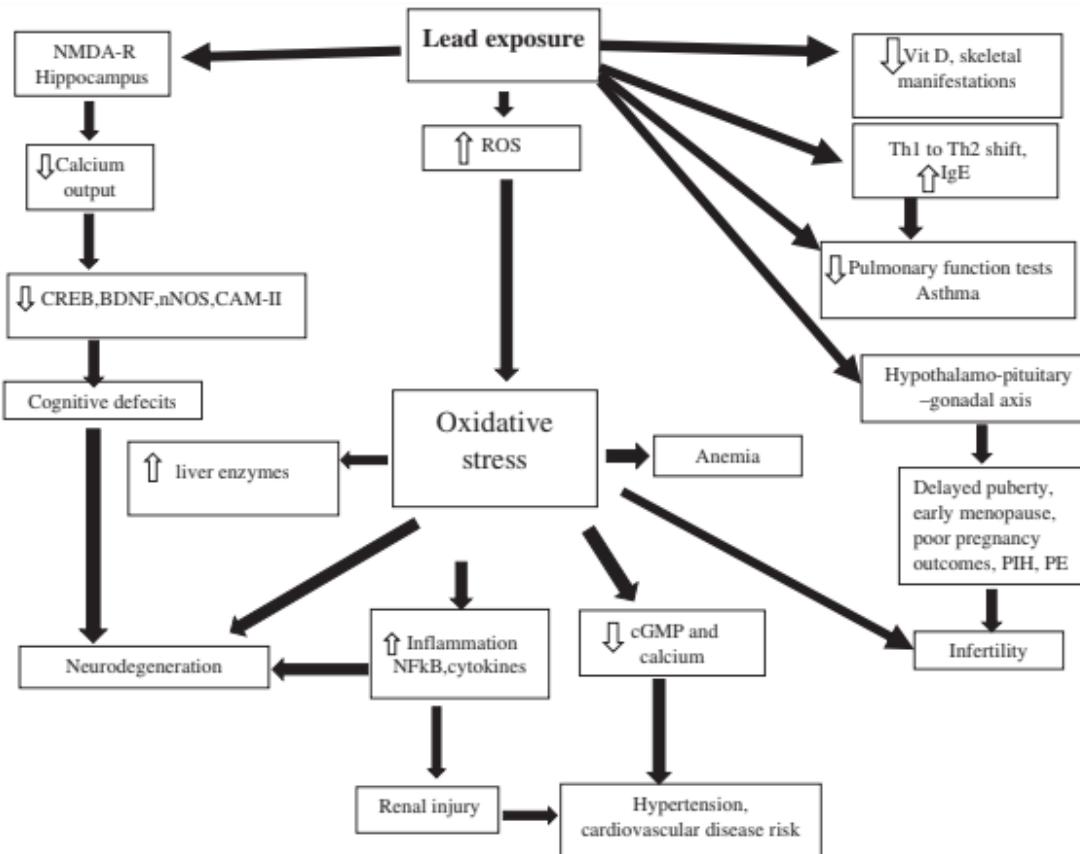
**Tabela 1. Tipo de ocorrência do Pb, fórmula química e produtos de solubilidade dos minerais e a biodisponibilidade.** Fonte: Bosso, 2008 (56).

O chumbo está disponível em forma orgânica e inorgânica seu nível de absorção depende de sua forma físico-química e as condições do indivíduo exposto. O chumbo inorgânico não é metabolizado, mas distribuído e depositado em tecidos moles e duros, para depois serem excretados diretamente. Enquanto o chumbo orgânico, antigamente utilizado como aditivo para gasolina, é facilmente absorvido pela pele e pelo trato respiratório. O chumbo, ao ser inalado, é quase completamente absorvido, enquanto o chumbo ingerido só é absorvido em uma proporção de 10 a 15%. O nível de absorção deste metal é maior em mulheres grávidas e crianças (57).

A toxicidade de chumbo pode gerar uma série de sintomas e sinais clínicos e bioquímicos. Efeitos neuronais em crianças são os mais comuns, como encefalopatias e deficiência cognitiva. Em adultos, efeitos hematológicos e renais, anemia e deficiência nutricional são os mais comuns. Entretanto, podem ocorrer também sintomas gastrointestinais e do sistema reprodutor, assim como outros mais graves como o câncer (58).

Sabe-se que o chumbo pode desencadear reações em diversos órgãos e moléculas do organismo de um ser vivo. O principal fator que unifica todas as

manifestações nocivas provenientes dessa exposição é o estresse oxidativo, uma ilustração generalizada de tais efeitos é apresentada na figura 9 (59). Ao se observar a tabela 1, o óxido de chumbo apresenta alta biodisponibilidade, corroborando essa observação.



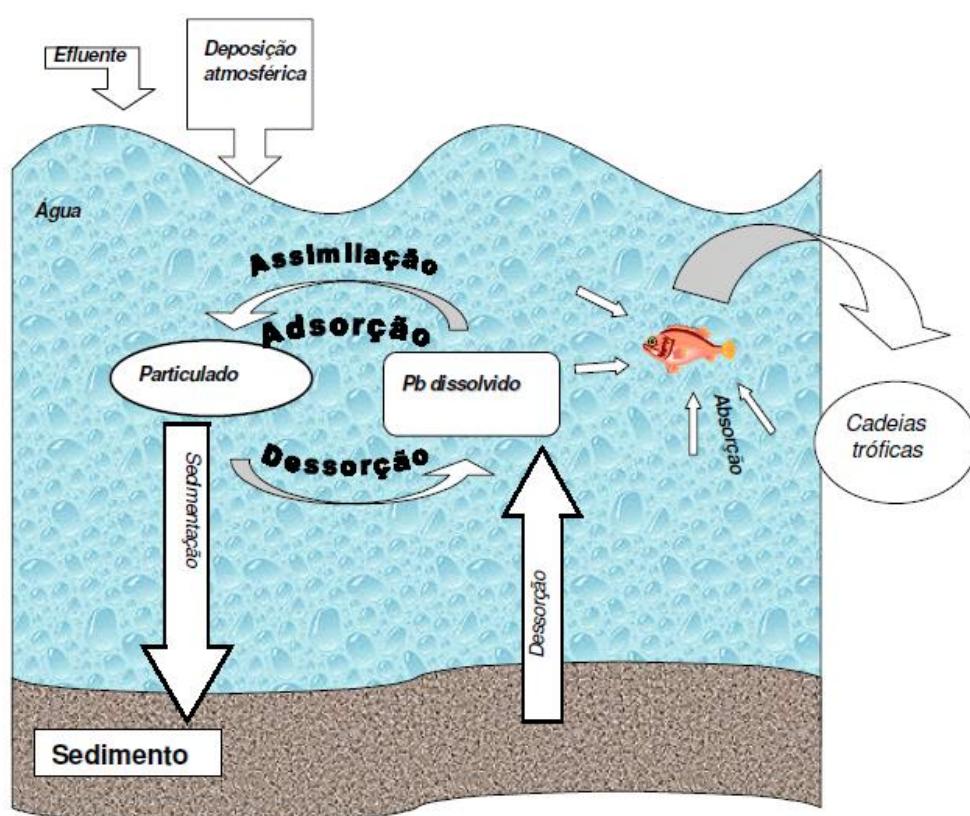
**Figura 9. Estresse oxidativo proveniente da exposição ao chumbo e sua manifestação em vários órgãos e moléculas.** Fonte: Mitra, 2017 (59).

Em países como França, Austrália e Estados Unidos da América, a exposição ao chumbo é residual pois há algumas décadas era comum a utilização de chumbo na gasolina, em joias, brinquedos, medicamentos e alguns alimentos. Já em países como China, Índia, Nigéria e México, a exposição da população se dá principalmente pela falta de regulamentação e medidas para a prevenção de exposição desnecessária e prejudicial do chumbo (60, 61).

Em ambientes aquáticos, o chumbo pode ser introduzido por processos naturais como por intemperismo (processo natural de decomposição e

desintegração de rochas e solos), por processos sedimentares, por erupções vulcânicas e por atividade humana, como mineração, processamento ou uso dos metais e/ou substâncias que utilizam o metal contaminante, lixiviação de rejeitos estocados e rompimento de barragens (62, 63, 64).

Estima-se em cerca de 0,02 µg/L a concentração natural de chumbo em águas superficiais. Entretanto, essa quantidade pode ser maior devido às descargas de efluentes industriais contendo o metal. Como mostrado na figura 10, o chumbo pode interagir com outros solutos, formando complexos e permanecendo na forma dissolvida, ou se agrregar a partículas orgânicas e inorgânicas por meio da adsorção (processo de adesão de moléculas a uma superfície sólida) ou da assimilação, sob forma de material particulado, que pode depositar-se no fundo do corpo d'água. Além disto, o chumbo pode retornar de forma dissolvida através da dessorção ou resolubilização. Esses processos permitem que diversos animais de diversas cadeias tróficas se contaminem (65).



**Figura 10. Processo de contaminação do chumbo em ambientes aquáticos.** Fonte: Paiva, 2005 (65).

## 2. OBJETIVOS

- a) Verificar proteção e resistência da *Artemia salina* exposta ao cloreto de chumbo (CL 10) após tratamento da água com diferentes potências de isoterápico de cloreto de chumbo, quanto à eclosão dos cistos e à atividade geral (mobilidade) de náuplios;
- b) Verificar possíveis interferências das fases lunares nesses parâmetros e nos tratamentos;
- c) Avaliar as propriedades físico-químicas dos isoterápicos e da água por meio da interação com corantes solvatocrônicos (método Cartwright) e identificação de chumbo particulado e outros elementos por meio de MEV-EDS, para proposição de mecanismos.

### 3. JUSTIFICATIVAS

A proposta de se construir um modelo experimental com *Artemia salina* para estudo de um papel protetor de isoterápicos na intoxicação por cloreto de chumbo se deu a partir de alguns fatores-chave:

- a) Potencial tóxico do chumbo no meio ambiente e em animais;
- b) O uso de isoterápicos é prática comum na medicina homeopática para tratamento de intoxicações crônicas, mas pouco se sabe sobre o papel ecológico de tais preparações;
- c) A *Artemia salina* está na base da cadeia trófica marinha, logo, compreender as respostas que essa espécie apresenta frente ao tratamento proposto representa grande impacto para as camadas seguintes da cadeia alimentar;
- d) Sendo um animal de extraordinária capacidade de adaptação, entende-se que seja um bom indicador de efeitos de preparações ultra diluídas, as quais modificam processos adaptativos em sistemas vivos, conforme literatura (1, 4, 6);
- e) Facilidade de manutenção desses animais em biotério;
- f) Sendo micro crustáceos com sistema nervoso central muito primitivo, constituído de gânglios interconectados e axônios formando feixes periféricos, o nível de senescênciia desses animais é considerado baixíssimo, sendo seu uso um modelo experimental alternativo que dispensa análise por comitê de ética;
- g) A escolha de se utilizar a CL 10 como concentração de desafio se deu pela intenção de mimetizar situações correntes de contaminação ambiental e intoxicação crônica de plantas, animais e homem, os quais estão em contínuo processo de exposição a tais resíduos em quantidades diminutas;
- h) Dentre os fatores ambientais que poderiam interferir nas análises, gerando resultados falso-positivos, escolheu-se monitorar as fases da lua, por representarem um fator interferente significativo no desenvolvimento de organismos marinhos, conforme literatura (38-42).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Preparação das matrizes dos isoterápicos

As matrizes dos isoterápicos de cloreto de chumbo foram preparadas a partir da solução-mãe de cloreto de chumbo 1M (SIGMA-MERCK, Saint Louis, USA, CAS number 7758-95-4) no laboratório da farmácia de manipulação homeopática HN Cristiano, em São Paulo, credenciada pela ANVISA para este fim. Todos as preparações homeopáticas foram feitas segundo a técnica prevista na Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3<sup>a</sup> edição (2011) e segundo as normas de segurança previstas pela instrução normativa nº11 do Ministério da Agricultura (2014).

As matrizes foram preparadas nas potências 5 cH, 29 cH e 199 cH e corresponderam à diluição centesimal (ou potência homeopática) anterior àquela utilizada no experimento. Todas foram preparadas em álcool de cereal 70%.

### 4.2. Preparo dos medicamentos

As potências escolhidas para o experimento foram as 6cH, 30cH e 200cH, por conta disto, foi necessária a preparação posterior, a partir das matrizes, no próprio laboratório de pesquisa, a fim de padronizar o tempo entre o preparo dos isoterápicos e sua aplicação na água de cultura das artemias, bem como para reduzir a concentração final de álcool a ser introduzida nas mesmas. Sendo a última diluição centesimal, a concentração de álcool atingida seria de 0,7%. Considerando o fator de diluição na água do mar como 1:10, a concentração final de álcool nas amostras foi de 0,07%.

Assim, as diluições (ou “potências”) de trabalho 6cH, 30cH e 200cH foram preparadas na véspera do experimento, em água estéril (obtida em sistema de purificação Direct-Q3, com SmartPark Direct Q3) e filtros Biopak (MERCK – MILLIORE, Darmstadt, Alemanha) e em cabine de fluxo laminar. Para cada 9,9 ml de água estéril foi colocado 100 µl da matriz homeopática, em frasco âmbar. Esse processo foi repetido para as três matrizes descritas acima e para o álcool

utilizado como veículo pela própria farmácia, sendo denominado *Ethilicum* 1cH. Os frascos foram submetidos ao processo de sucussão automática (agitação vertical ritmada) em braço mecânico Denise® (AUTIC, São Paulo, Brasil).

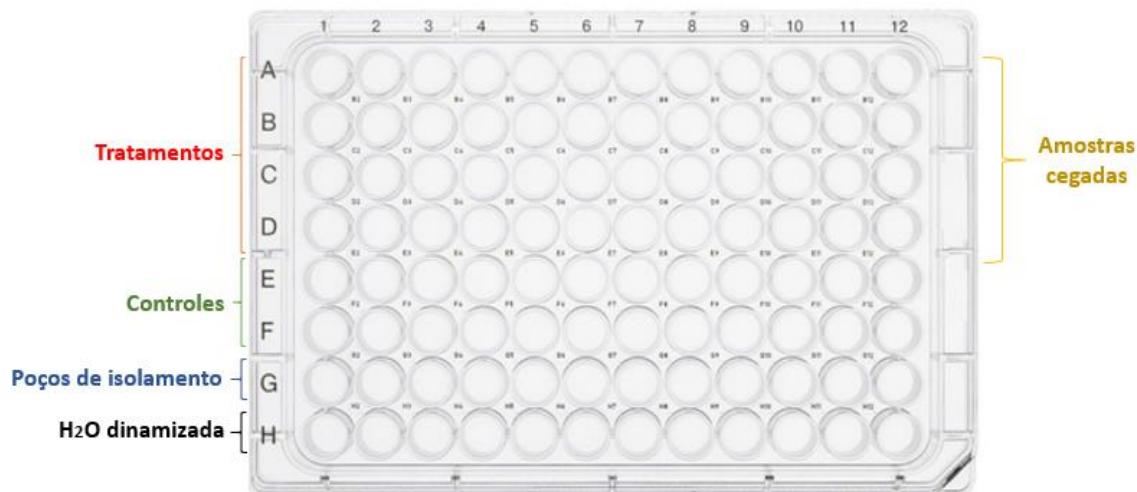
Os controles utilizados no experimento foram o *Ethilicum* 1cH (cujo insumo ativo foi o mesmo etanol utilizado para preparar os outros medicamentos) e água purificada estéril, ambos submetidos aos mesmos procedimentos de diluição e sucussão empregado para os outros três medicamentos (6cH, 30cH, 200cH). Além destes dois controles, um controle adicional foi incluído, a água purificada estéril não sucussionada. Tais controles permitiram distinguir possíveis efeitos específicos dos isoterápicos de efeitos inespecíficos do álcool 0,07%, da variação de osmolaridade da água do mar pela simples inserção dos tratamentos e de micro ou nanobolhas resultantes da sucussão. A linha-base foi estabelecida pela cultura de *Artemia salina* não desafiada e não tratada.

Ao final do preparo, os seguintes tratamentos foram obtidos:

- $\text{PbCl}_2$  6cH
- $\text{PbCl}_2$  30cH
- $\text{PbCl}_2$  200cH
- *Ethilicum* 1cH
- $\text{H}_2\text{O}$  sucussionada (água purificada estéril sucussionada)
- Água não sucussionada (água purificada estéril não sucussionada)
- Não desafiado (linha-base)

#### 4.3. Codificação dos frascos

Os fracos contendo  $\text{PbCl}_2$  6cH,  $\text{PbCl}_2$  30cH,  $\text{PbCl}_2$  200cH, *Ethilicum* 1cH, foram nomeados por códigos de maneira aleatória, de A a D, por um funcionário do laboratório não envolvido no experimento, antes do início do estudo. Os poços contendo cistos de *Artemia salina* desafiados e tratados com água purificada estéril, os poços contendo cistos de *Artemia salina* não desafiados e não tratados e os poços contendo cistos *Artemia salina* desafiados e tratados com água dinamizada não foram cegados, compondo o grupo aberto, assim como mostra a figura 11.



**Figura 11. Desenho experimental padronizado de todas as placas de 96 poços utilizadas no experimento:** em “tratamentos” foi colocado cada um dos tratamentos utilizados no experimento ( $PbCl_2$  6cH,  $PbCl_2$  30cH,  $PbCl_2$  200cH, *Ethilicum* 1cH, fileiras de A a D), em “controles” estavam os poços desafiados e tratados com água purificada estéril (grupo desafiado, fileira E) e os poços não desafiados e não tratados (grupo branco, fileira F), em “poços de isolamento” não foi inserido nada, esses poços serviram apenas para isolar as amostras dos poços H das demais amostras (fileira G), e em “H<sub>2</sub>O dinamizada” estavam os poços desafiados e tratados com água dinamizada (fileira H).

Fonte: Própria autora, 2020.

Desta forma, cada placa recebeu a seguinte composição:

- Poços da fileira A: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com o medicamento A, anteriormente cegado;
- Poços da fileira B: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com o medicamento B, anteriormente cegado;
- Poços da fileira C: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com o medicamento C, anteriormente cegado;
- Poços da fileira D: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com o medicamento D, anteriormente cegado;
- Poços da fileira E: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com água purificada estéril, grupo desafiado;
- Poços da fileira F: não desafiados e não tratados, grupo branco;
- Poços da fileira H: desafiados com CL 10 de cloreto de chumbo e tratados com água dinamizado.

É importante mencionar que em cada placa os poços da fileira G foram utilizados para isolar os poços tratados com água dinamizada de qualquer outro poço, a fim de minimizar possíveis interferências.

As etiquetas originais e os respectivos códigos foram mantidos em envelope lacrado e sem acesso durante todo o experimento. Este só foi revelado após o término das observações, portanto, esse foi um estudo em cego.

#### **4.4. Eclosão de cistos de *Artemia salina* em função das fases da lua**

O estudo foi conduzido ao longo de 4 semanas, sendo cada semana correspondente a uma fase da lua, os experimentos referentes à lua cheia foram realizados do dia 26/11/2018 ao dia 30/11/2018, os experimentos referentes à lua nova foram realizados do dia 10/12/2018 ao dia 14/12/2018, os experimentos referentes à lua crescente foram realizados do dia 17/12/2018 ao dia 21/12/2018 e os experimentos referentes à lua cheia foram realizados do dia 25/02/2019 ao dia 01/03/2019. Três repetições experimentais, em triplicata foram realizadas em cada semana. Cada placa de 96 poços correspondeu a uma unidade experimental, ou seja, 9 unidades experimentais por fase da lua onde em cada poço havia de 5 a 8 cistos submetidos à eclosão.

##### **4.4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos**

O presente estudo não utilizou animais vertebrados. Conforme a legislação nacional (CONCEA) e internacional (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), a análise do projeto pelo comitê de ética nesse caso foi dispensável.

Para cada placa de 96 poços foram testados 7 tratamentos com 12 repetições equivalentes a 12 poços. Os tratamentos foram:

- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com isoterápico de cloreto de chumbo 6cH;
- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com isoterápico de cloreto de chumbo 30cH;

- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com isoterápico de cloreto de chumbo 200cH;
- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com *Ethilicum* 1cH;
- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com água purificada estéril;
- Cistos desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e tratados com água purificada estéril sucussionada;
- Cistos **não** desafiados com  $PbCl_2$  em concentração letal 10% e **não** tratados.

Foi determinado que em cada poço haveria 100  $\mu$ l de água marinha artificial com alimento e cistos de *Artemia salina*, 10  $\mu$ l do tratamento respectivo tratamento (ou o equivalente de água do mar, para o grupo não desafiado) e 90  $\mu$ l de uma solução aquosa de  $PbCl_2$  capaz de produzir, no poço, concentração equivalente à CL 10 (estabelecida anteriormente em estudo piloto), ou seja: 0,04% (ver item 4.4.4). Assim, o volume final de cada poço foi de 200  $\mu$ l.

As placas foram colocadas em uma gaiola de Faraday (produzida com uma caixa de papelão revestida internamente com papel alumínio) por até 48 horas, sendo retiradas apenas para a análise de eclosão e mobilidade. Cada poço foi avaliado em dois períodos, 24 horas e 48 horas, com uma lupa digital (microscópio digital com zoom de 1000x R Câmera 2.0 mega pixels USB 6 leds, China) e os dados foram registrados por um programa de captura de vídeos e imagens (AMCAP, Beijing, China). Os dados consistiam em número de náuplios vivos, número de náuplios mortos, número de cistos não eclodidos e número de cistos em estágio guarda-chuva. Foram capturadas imagens de todos os poços e vídeos foram feitos apenas dos poços que continham náuplios vivos.

Após esse processo, as placas foram congeladas até as análises físico-químicas, assim como mostra a figura 12.



**Figura 12. Etapas do experimento de análise de eclosão de cistos de *Artemia salina*.** Fonte: Própria autora, 2020.

#### 4.4.2. Preparação da água marinha artificial

Para a preparação de 1 L de água marinha artificial foram necessários 1 L de água destilada e 30 g de sal marinho artificial Ocean Fish® (Cittadella, PD, ITALIA), sob agitação constante de um agitador magnético. Ao longo das 4 semanas, em cada semana foi preparada uma nova água marinha artificial a fim de evitar a inserção de variáveis enviesadas, a partir dos procedimentos padronizados anteriormente.

#### 4.4.3. Preparação de alimento para *Artemia salina*

Para cada 50 mg de fermento biológico Fleischchimann® (*Saccharomyces cerevisiae*) foi necessário 10 ml de água marinha artificial. Essa quantidade de fermento foi definida em estudo piloto como o suficiente para alimentar os animais e não comprometer a visibilidade da água. Ao longo das 4 semanas, em cada semana foi preparada um novo alimento a fim de evitar a inserção de variáveis enviesadas, a partir dos procedimentos padronizados anteriormente.

#### **4.4.4. Definição de concentração letal 10% (CL 10)**

A substância tóxica utilizada durante o experimento foi o cloreto de chumbo, em concentração equivalente à CL 10. Essa concentração foi definida previamente em um experimento piloto e teve como base a intenção de se construir um modelo experimental que mimetizasse as condições mais rotineiras de contaminação ambiental, em que concentrações muito pequenas de agentes tóxicos são encontradas, sobretudo na água.

Em tubos, preparou-se 11 diluições seriadas de  $\text{PbCl}_2$  em escala 1:1, sendo o primeiro contendo 1ml de água do mar com alimento e 1 ml da solução-mãe de  $\text{PbCl}_2$ . Os demais tubos foram preenchidos com 1 ml de água do mar com alimento e 1 ml da diluição anterior. O conteúdo de cada tubo foi transferido para 11 poços, em uma quantidade de 100  $\mu\text{l}$  por poço. Seis séries de diluições (repetições) foram feitas nesta placa, completando 66 poços.

Em paralelo, um becker foi preparado com 396 ml de água marinha artificial, 4 ml de alimento (5 mg/ml de fermento), correspondente a 10% e 0,6 g de cistos. Aguardou-se 48 horas para promover a eclosão dos cistos. Os náuplios nascidos foram transferidos para a placa, em um volume de 100  $\mu\text{l}$  por poço. Na última fileira, 200  $\mu\text{l}$  por poço foram inseridos, para cálculo da porcentagem de sobrevida de náuplios não desafiados, como controle. Após duas horas, verificou-se a mortalidade.

A avaliação de mortalidade foi realizada com o auxílio de uma lupa digital (microscópio digital com zoom de 1000x R Câmera 2.0 mega pixels USB 6 leds, China). Registrou-se o número de náuplios vivos e náuplios mortos para cada poço e calculou-se a porcentagem de viabilidade com base no total de repetições. Na tabela 2, pode-se observar os resultados.

**Tabela 2. Resultado de eclosão de diversas concentrações de cloreto de chumbo para a determinação de concentração letal 10%.**

Poços	Concentração (%)	Vivos	Mortos	Viabilidade (%)
1	50%	22	21	51%
2	25%	24	18	57%
3	12,5%	21	3	87%
4	6,25%	24	1	96%
5	3,125%	28	3	90%
6	1,56%	38	0	100%
7	0,78%	29	0	100%
8	0,39%	36	4	90%
9	0,19%	26	4	86%
10	0,09%	35	4	89%
11	0,048%	33	0	100%
12	Zero	27	2	93%

A partir desses resultados determinamos que a melhor concentração de PbCl<sub>2</sub> que representou a CL 10 do estudo foi a concentração de 0,04% (aproximadamente 4x10<sup>-4</sup> M, sendo que a solução-mãe foi preparada a 1M), descontando os valores de viabilidade da linha-base (93%).

Ao longo das 4 semanas, em cada semana foi preparada uma nova CL 10 a fim de evitar a inserção de variáveis enviesadas, a partir dos procedimentos padronizados anteriormente.

#### 4.4.5. Preparo das placas

Foram preparadas, no total, 36 placas, sendo que cada 9 placas correspondiam à uma fase lunar (cheia, nova, crescente e minguante). Para a preparação das placas, foi necessário preparar previamente um becker de eclosão e um becker correspondente à CL 10 do PbCl<sub>2</sub>.

Para o becker de eclosão foi colocada em um becker, separadamente, 200 ml de água marinha artificial preparada a partir do protocolo padronizado anteriormente (item 4.4.2), com alimento na proporção previamente estabelecida (item 4.4.3) e 0,075 g de cistos (quantidade suficiente para se obter 5 a 8 cistos para cada fração de 100 µl, volume inserido em cada poço). Essa suspensão de

cistos foi homogeneizada constantemente e os poços foram preenchidos imediatamente, para que os cistos eclodissem apenas nas placas.

Para o becker correspondente à CL 10 foi preparado separadamente uma quantidade 80 ml de água marinha artificial contendo 32  $\mu$ l de  $PbCl_2$  (0,04%) para distribuição de 100  $\mu$ l por poço.

Com base nisto, o volume final de cada poço correspondeu à 100  $\mu$ l de água marinha artificial com cistos e alimento, 90  $\mu$ l de CL 10 de  $PbCl_2$  e foi inserido 10  $\mu$ l de cada isoterápico ou soluções controle, de acordo com a fileira estabelecida para tratamento. Apenas os poços da fileira F foram preenchidos com água do mar sem adição de  $PbCl_2$ . Os poços da fileira G não foram utilizados, para isolar os poços tratado com água sucussionada (poços H) dos demais tratamentos.

Esse processo de preparação de placa durou quatro semanas, conforme as fases da lua.

#### **4.4.6. Análise das placas**

A observação dos náuplios por poço foi feita com o auxílio de lupa digital (microscópio digital com zoom de 1000x R Câmera 2.0 mega pixels USB 6 leds, China), ao longo de 4 semanas, onde em cada semana foi preparada e analisada 9 placas, resultando em 36 placas finais, e os parâmetros registrados foram os seguintes:

- Número de náuplios nascidos em todos os estágios (vivos, mortos e guarda-chuva);
- Número de cistos não eclodidos;
- Registro de vídeo de 13 segundos para posterior análise dos padrões de deslocamento;
- A análise da eclosão levou em conta a somatória de náuplios nos 12 poços de cada tratamento/placa, sendo considerada como unidade experimental;
- N = 9 (nove placas) por fase da lua;
- Cerca de 750 náuplios foram analisados por lua / tratamento;

- Somatória de cerca de 20.000 náuplios considerando todas as 36 placas.

## 4.5. Mobilidade

O Image J é um software capaz de identificar e analisar imagens. Neste experimento, o Image J foi utilizado para quantificar as paradas e a movimentação dos náuplios de cada poço.

### 4.5.1. Escolha das placas

Foi escolhido para análise todas as placas da lua cheia (placas de 1 a 9). A lua cheia foi escolhida especialmente por conta dos dados da eclosão, sendo observada maior eclosão nesse período.

### 4.5.2. Análise

Os vídeos foram registrados em formato AVI e a mobilidade de todos os poços foi calculada automaticamente pela função *Plug-in Trackmate* do software Image J.

O programa foi ajustado para leitura de cores RGB seguindo como padrão a coloração amarela dos náuplios para ser usada como referência no rastreamento da mobilidade. Todas as imagens foram transformadas para resolução binária de 8 bits e o método de análise escolhido foi o *Phansalkar*. Após a análise pelo *Plug-in Trackmate*, os dados gerados na planilha *Track Statistics* foram copiados e transferidos para o Excel®, onde se obteve a média de *Track Stop*, que traduz o número de paradas dos náuplios e a média de *Track Displacement*, que traduz a movimentação dos náuplios no poço. O valor de cada parâmetro foi expresso em gráficos.

## 4.6. Microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

O MEV-EDS é um método utilizado para a produção de imagens em alta ampliação e resolução (MEV – microscopia eletrônica de varredura) com

identificação simultânea dos elementos químicos presentes na amostra (EDS – espectroscopia de energia dispersiva), visto que cada um tem uma assinatura específica de absorção de elétrons e de emissão de raio X. A análise foi realizada nas amostras de água de duas placas selecionadas, a fim de caracterizar as superfícies dos depósitos obtidos em relação a suas propriedades e composição.

#### **4.6.1. Escolha das placas**

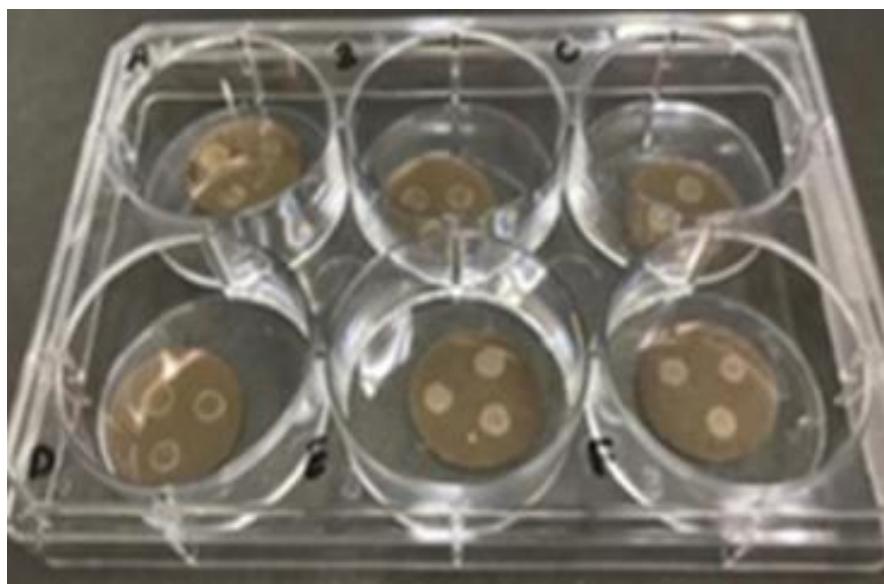
As placas 3 (lua cheia) e 36 (lua minguante) foram escolhidas para esse ensaio, em função dos resultados obtidos no teste de eclosão. A escolha das placas se deu por conta da placa 3 representar o início dos experimentos e da placa 26 representar o final dos experimentos, além disto, a lua cheia apresentou resultados biológicos mais evidentes, por isso foi importante analisá-la.

#### **4.6.2. Preparo das amostras**

Foi necessário deixar as placas escolhidas descongelando naturalmente por cerca de 30 minutos. Após o descongelamento, o conteúdo de cada fileira de poços (cada tratamento) das duas placas, separadamente foi transferido para microtubos previamente identificados, os quais foram posteriormente centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm (11,068g, Centrífuga MCA mod. 1 – 4K, Sigma, Osterode am Harz, Alemanha).

O sobrenadante foi, então, filtrado em filtro de 0,22 µm (Millipore, Burlington, MS, USA) e transferido para outro microtubo, para ser novamente centrifugado por 1 hora, a 10000 rpm (11.200g) (Centrífuga MCA mod. 1 – 4K, Sigma, Osterode am Harz, Alemanha).

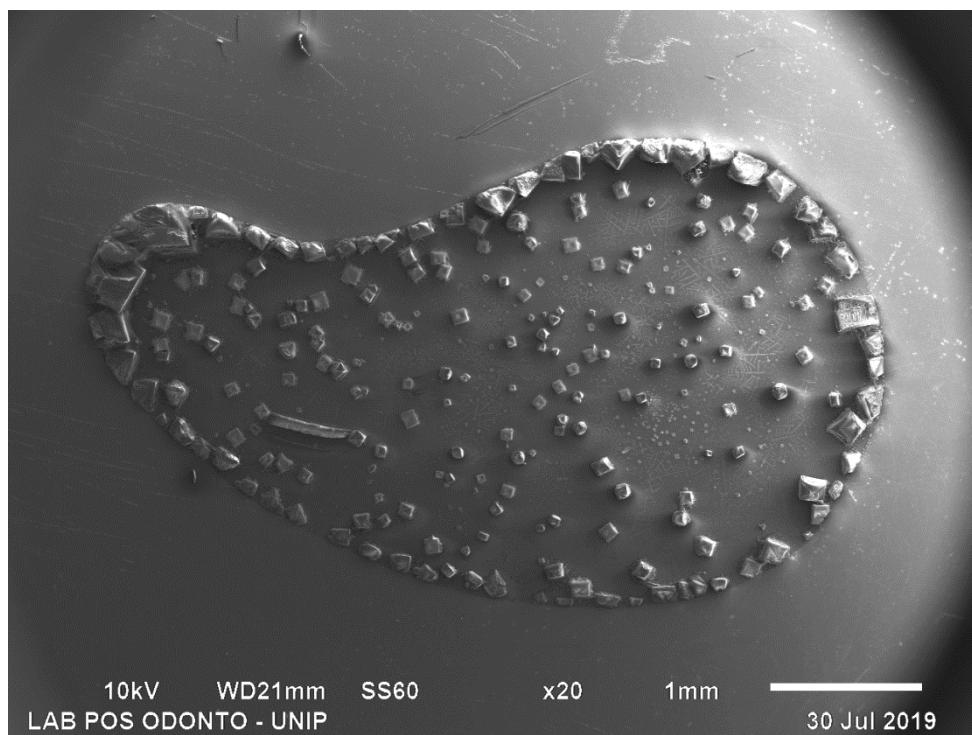
Feito isso, foi retirado 5 µl do sedimento de cada tubo e transferido para lamínulas previamente metalizadas (figura 13), em triplicata e identificadas separadamente. Após secagem em estufa, com a placa fechada, as lamínulas foram transferidas para câmera de vácuo (Desk V, Denton Vacuum, Corporate Headquaters Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) para obtenção do ponto crítico.



**Figura 13. Placa de 6 poços com lamínulas metalizadas e os respectivos sedimentos, em triplicata, para análise em MEV-EDS.** Fonte: Pinto, 2020.

#### 4.6.3. Análise

As amostras das gotículas foram analisadas no microscópico eletrônico de varredura (MEV), em um aumento de 20 vezes (figura 14), a fim de identificar componentes químicos presentes na amostra.



**Figura 14. Imagem de gotícula gerada a partir de amostra de água tratada com  $\text{PbCl}_2\text{ 6cH}$ .** Imagem ampliada 20 vezes e depositada sobre lamínula metalizada. Fonte: Laboratório da Universidade Paulista, 2020.

Os dados de imagem e valores (% de átomos) foram salvos em CDs e as lamínulas armazenadas para análises futuras. Os resultados foram representados em gráficos e tabelas.

#### 4.7. Método Cartwright

A proposta do método de Cartwright é definir o padrão de cada amostra ultra diluída através de espectroscopia de UV-visível, que usa como reagente corantes solvatocrônicos e é baseado no fenômeno da solvatocromia. Tais corantes apresentam sensibilidade suficiente para demonstrar qualquer mínima diferença no espectro de absorbância, sempre que o solvente sofre modificações estruturais.

#### 4.7.1. Escolha das placas

A escolha foi feita com o intuito de analisar todas as fases da lua nos diferentes tratamentos, com base nisto, as placas escolhidas foram:

- Placa 4 da lua cheia;
- Placa 13 da lua nova;
- Placa 26 da lua crescente;
- Placa 35 da lua minguante.

#### 4.7.2. Preparo das amostras

O conteúdo de cada fileira de tratamento, de cada placa, foi transferido para microtubos e centrifugado, para separação dos náuplios e do sobrenadante. Os tubos foram centrifugados por uma hora a 10.000 rpm (11.200g). Em seguida, 100  $\mu$ l de cada sobrenadante foram transferidos para frasco âmbar com 9,9 ml de água purificada estéril. O conteúdo de cada frasco foi posteriormente filtrado em filtro de malha 0,22  $\mu$ m (Millipore, Burlington, USA) e transferido para outro frasco, fechado com batoque e tampa de rosca e, finalmente, sucussionado em braço mecânico (Denise-AUTIC, São Paulo, Brasil).

Trinta e quatro amostras foram analisadas, sendo 7 tratamentos para cada fase da lua, mais as amostras dos outros 6 medicamentos, sendo eles água sucussionada, água não sucussionadas, *Ethilicum* 1cH, PbCl<sub>2</sub> 6cH, PbCl<sub>2</sub> 30cH e PbCl<sub>2</sub> 200cH. As amostras foram codificadas com o auxílio de um funcionário do centro de pesquisa, não participante do experimento, para que as leituras fossem feitas em cego.

#### 4.7.3. Preparo dos corantes

Os corantes utilizados no experimento foram o ET30, cumarina, vermelho do Nilo, N,N – dimetilindoanilina (NN-DMIA), rodamina, violeta metileno e ET33. Cada corante foi preparado separadamente, por um funcionário do laboratório, de acordo com a molaridade indicada para cada corante (18, 74, 75), sendo os mesmos diluídos em álcool absoluto, conforme a tabela 3. Os cálculos foram

ajustados para um volume final de 160 ml de álcool absoluto (Synth, São Paulo, Brasil). A fórmula utilizada para concentração molar foi a seguinte:

$$Molaridade = \frac{m (g)}{peso molecular \times volume}$$

Os corantes foram processados separadamente em fluxo laminar, utilizando a quantidade de álcool e de corante necessário, e o conteúdo de cada um foi transferido para um tubo Falcon envolto em papel alumínio, para não sofrer alterações de luminosidade e volatilidade.

#### 4.7.4. Definição do pico de absorbância

O espectrofotômetro utilizado no experimento (FEMTO 800 XI®, São Paulo, Brasil), com sensibilidade de 1nm, foi calibrado com corante puro. Para isso, foi necessário realizar a leitura de uma cubeta com álcool absoluto, a fim de se definir a linha base. Os corantes foram lidos em varredura no espectro de luz visível, entre 350 e 800 nm (nanômetros) para determinação do pico de absorbância de cada um. Com esta definição, foi feita nova calibragem do aparelho e leitura de todas as amostras no respectivo pico.

É importante mencionar que esse processo foi realizado para todos os corantes, visto que em cada um há um comprimento de onda e pico de absorbância específico (tabela 3).

**Tabela 3. Corante utilizados para a análise de espectroscopia pelo método Cartwright.**

Corante	Cor em álcool puro	Molaridade	Comprimento de onda do pico de absorbância
ET 30 (Reichardt's Dye)	Violeta	200 µM	351 nm (abs. 0,856)
Cumarina 7	Verde/amarelo fluorescente	25 µM	429 nm (abs. 0,648)
Vermelho do Nilo	Rosa choque	20 µM	553 nm (abs. 0,362)
N,N - Dimetilindoanilina	Azul	25 µM	598 nm (abs. 0,397)
Rodamina	Amarelo	50 µM	448 nm (abs. 0,627)
Violeta metíleno (+) (MV)	Purpura	50 µM	597 nm (abs. 0,573)
ET 33 (-)			469 nm
2,6-DICLORO – 4 - (Trifenilpiridinium – 1 - il) - FENOLATO	Laranja	245 µM	(abs. 0,398)

#### 4.7.5. Preparo e leitura das cubetas

A partir das 34 amostras, sendo elas 7 tratamentos para cada fase da lua (28 no total) mais 6 medicamentos, foram preparadas 102 cubetas por corante, para se obter a triplicata das amostras. Em cada cubeta foram inseridos 25 µl da amostra mais 1475 µl de cada corante, devidamente filtrado (malha de 0,22 µm, Millipore, Burlington, USA). Com o pico de absorbância e comprimento de onda determinados (item 4.7.5), foi realizada a leitura de cada uma dessas cubetas. Os valores foram anotados e transferidos para uma planilha, para posterior análise estatística.

#### 4.8. Análise estatística

A fim de se investigar se haveria efeito do tratamento (vide item 5.4.1), da fase lua (lua crescente, cheia, nova ou minguante) e do tempo de observação

(24 ou 48 horas) sobre a taxa de eclosão dos cistos, utilizou-se uma Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores com modelos mistos. A taxa de eclosão relativa (%) foi calculada efetuando-se o somatório de náuplios (fases instar I-V), vivos ou mortos, por grupo, divididos pelo mesmo contingente de náuplios do grupo não desafiado, conforme equação abaixo:

$$\text{Taxa de eclosão relativa (\%)} = \frac{(GC+NV+NM)\text{grupo}}{\text{média}(GC+NV+NM)\text{não desafiado}}$$

Os pressupostos do teste de hipóteses foram investigados: (1) os dados apresentaram distribuição normal, conforme evidenciado pelo teste de Shapiro-Wilk, bem como pela inspeção gráfica de *Q-Q plots*; (2) eventuais valores considerados *outliers* em um grupo foram excluídos da análise, após inspeção de gráficos *box-plot*; (3) a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene; (4) a esfericidade foi avaliada pelo teste de Mauchly. Para todos os casos, o nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ , considerando-se efeitos significativos que obtiveram chance de erro  $p < 0,05$ . Comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey.

A fim de se avaliar o efeito do tratamento sobre a taxa de locomoção dos náuplios e sobre o número de paradas destes (conforme descrito em item 5.5), empregou-se uma Análise de Variância de um fator. Os resultados foram expressos em número de pixels por náuplio por placa em cada tratamento.

Os pressupostos do teste de hipóteses foram investigados: (1) os dados apresentaram distribuição normal, conforme evidenciado pelo teste de Shapiro-Wilk, bem como pela inspeção gráfica de *Q-Q plots*; (2) eventuais valores considerados *outliers* em um grupo foram excluídos da análise, após inspeção de gráficos *box-plot*; (3) a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ , considerando-se efeitos significativos que obtiveram chance de erro  $p < 0,05$ . Comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey.

A fim de se investigar o efeito do tratamento sobre o percentual médio de cada elemento químico no precipitado sólido da água do mar (conforme descrito

em item 5.6) empregou-se uma Análise de Variância de um fator. Os pressupostos do teste de hipóteses foram investigados conforme descrito acima para locomoção. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ , considerando-se efeitos significativos que obtiveram chance de erro  $p < 0,05$ . Comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey.

Para se avaliar o efeito do tratamento e da fase da lua sobre a análise da água do mar na interação com corantes solvatocrônicos foi utilizada uma Análise de Variância de dois fatores. Os pressupostos do teste de hipóteses foram investigados conforme descrito acima para locomoção. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ , considerando-se efeitos significativos que obtiveram chance de erro  $p < 0,05$ . Comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey. E para avaliar o efeito dos medicamentos na interação com corantes solvatocrônicos foi utilizada uma Análise de Variância de um fator. Os pressupostos do teste de hipótese foram investigados conforme descrito acima. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ , considerando-se efeitos significativos que obtiveram chance de erro  $p < 0,05$ .

Os programas utilizados para a análise estatística foram:

- Statistica v 12.0;
- IBM SPSS v 21.0;
- Excel 2019 v 16.0.6742.2048.

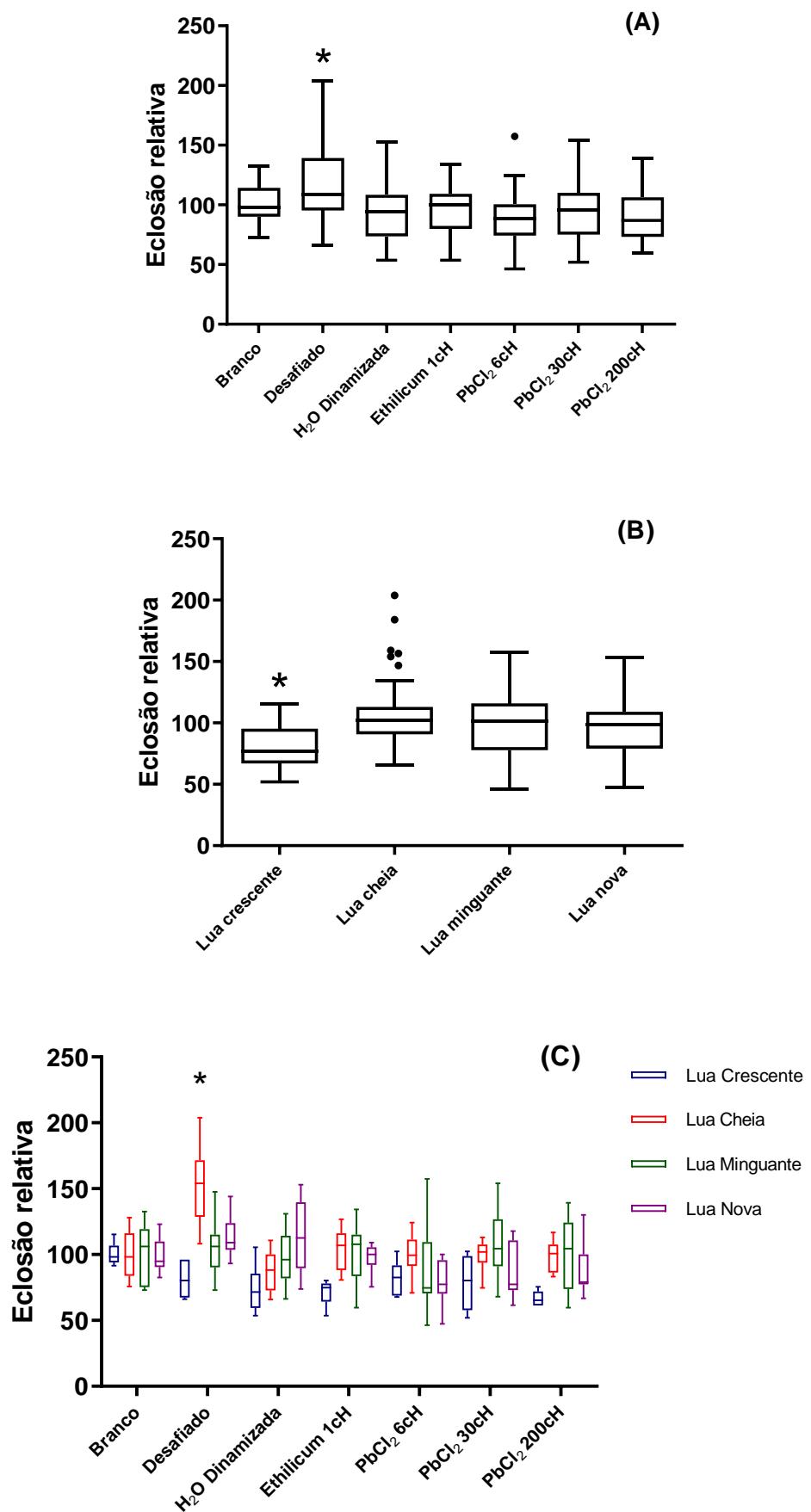
E foi utilizado o GraphPad Prism 8.0.1 para a criação de todos os gráficos apresentados nesse trabalho.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise da eclosão dos cistos em função da fase da lua

Ao analisar os tratamentos separadamente unindo todas as luas, a taxa de eclosão dos cistos foi maior no grupo tratado com água não sucussionada (“desafiado”) em relação às demais condições. Ao unir todos os tratamentos e observar apenas o efeito da taxa de eclosão nas diferentes luas, houve menor eclosão na lua crescente. Observou-se maior taxa eclosão do grupo intoxicado com  $PbCl_2$  e tratado com água não sucussionada (controle), em todas as luas, mas o efeito foi maior na lua cheia, em relação ao grupo não desafiado. Os demais tratamentos, independentemente da potência utilizada reduziram a taxa de eclosão para patamares comparáveis ao grupo não desafiado. Logo, não houve efeito específico de nenhuma potência isoterápica, contudo, observa-se certo efeito protetivo de todos os tratamentos que envolveram o preparo por meio de sucussão do líquido. Podemos observar esses efeitos no gráfico 1.

É importante mencionar que apenas o grupo tratado somente com água (“desafiado”) foi intoxicado e não tratado com qualquer preparação sucussionada. Todos os demais grupos de tratamento foram expostos ao cloreto de chumbo e, em determinado momento, receberam também a preparação sucussionada. Esses resultados apontam que o efeito das preparações isoterápicas testadas não se deu de forma específica para cada potência (diluição homeopática), mas sim pela sucussão da água.

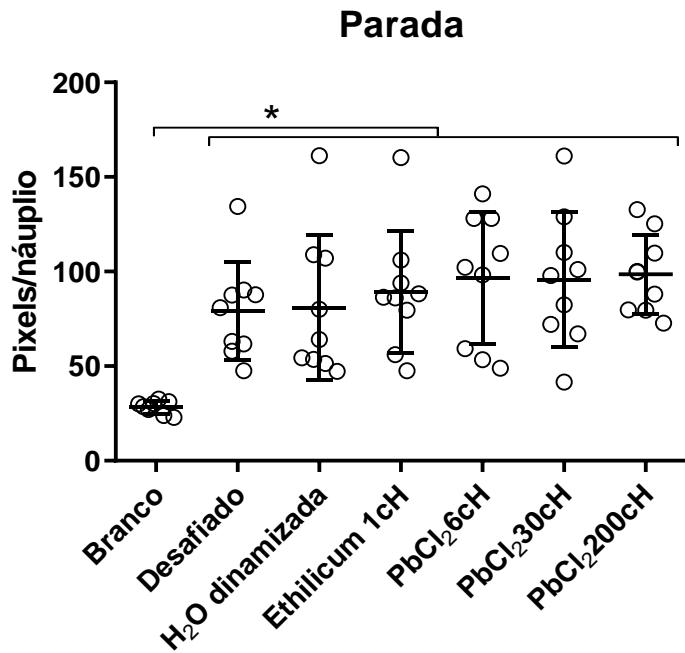


**Gráfico 1: (A) Efeito dos tratamentos na eclosão dos cistos, (B) Efeito das fases da lua sobre eclosão dos cistos, (C) Efeito da interação entre os tratamentos e as fases da lua.** Os valores representam média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% para a média. (A) Houve efeito significativo da taxa de eclosão e tratamento sobre a taxa de eclosão relativas dos cistos, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ( $F_{(6; 201)} = 6,953$ ,  $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,171$ ). O pós-teste de Tukey indicou diferenças na taxa de eclosão dos cistos “desafiados” em relação aos demais grupos ( $*p < 0,05$ ). Em outras palavras, os cistos presentes nos poços “desafiados” eclodiram mais que os cistos não desafiados. Os tratamentos com solventes sucussionados resultaram em redução da taxa de eclosão para níveis comparáveis ao grupo não desafiado. O ponto representado no gráfico indica a presença de um outlier. (B) Houve efeito significativo da interação da lua e a taxa de eclosão dos cistos sobre a taxa de eclosão relativa, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ( $F_{(3; 195)} = 14,369$ ,  $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,181$ ). Segundo pós-teste de Tukey ( $*p < 0,05$ ), houve menor eclosão dos cistos na lua crescente, em comparação com as demais luas. Os pontos representados no gráfico indicam a presença de outliers. (C) Houve efeito significativo da interação entre os tratamentos e a fase da lua sobre a taxa de eclosão relativa, segundo ANOVA de dois fatores com modelos mistos ( $F_{(18; 202)} = 3,185$ ,  $p = 0,00003$ ,  $\eta^2 = 0,221$ ). Foram encontradas diferenças, na lua cheia, entre taxa de eclosão do grupo tratado com água não sucussionada (“desafiado”) e a taxa de eclosão dos demais grupos, segundo pós-teste de Tukey ( $*p < 0,05$ )

## 5.2. Análise da mobilidade dos náuplios por Image J

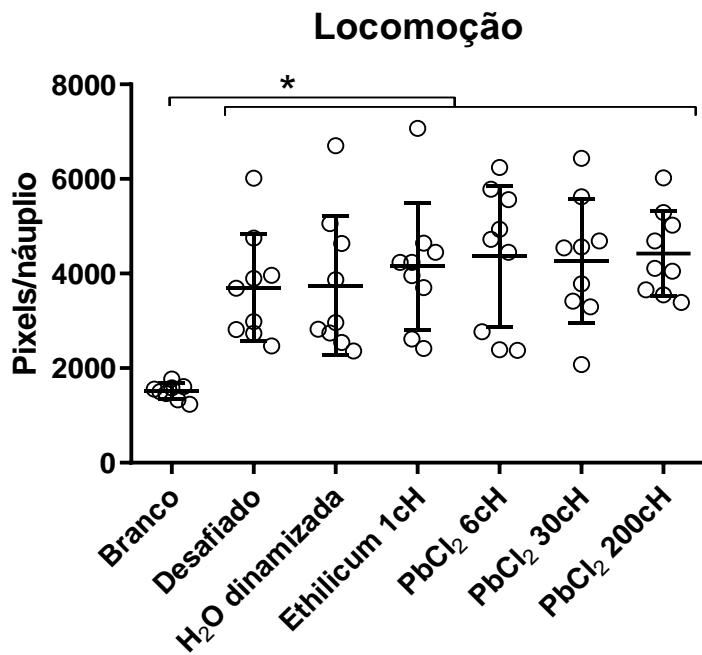
Por conta da maior eclosão dos náuplios desafiados com  $PbCl_2$  em fase de lua cheia, analisou-se através do software Image J – *plug-in Trackmate* o número de paradas e a locomoção dos náuplios, em pixels, nas placas 1 a 9, após 48 horas de eclosão. Entende-se por locomoção a distância percorrida pelos náuplios dentro do poço.

O gráfico 2 mostra o número de paradas dos náuplios eclodidos entre os tratamentos estudados, na lua cheia. Todos os animais desafiados com cloreto de chumbo apresentaram aumento no número de paradas.



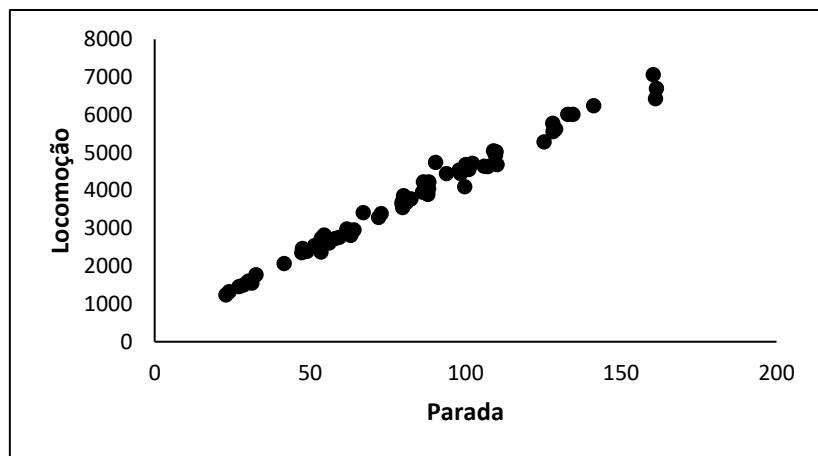
**Gráfico 2: Número de paradas dos náuplios em cada um dos tratamentos durante a lua cheia.** Os valores representam média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% para a média. Houve efeito significativo do número de parada dos náuplios do grupo “branco” em relação aos demais tratamentos, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ( $F_{(6; 22; 103)} = 33,253$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,379$ ). Os pressupostos do teste foram respeitados e foi necessário a retirada de um outlier. O pós-teste de Tukey ( $*p < 0,05$ ) indicou diferenças no número de parada dos náuplios dos poços “branco” em relação ao demais tratamentos.

No gráfico 3 está representada a locomoção dos náuplios nos diferentes tratamentos. Assim como no anterior, não se observou diferença entre os tratamentos, apenas o grupo não desafiado diferiu dos demais grupos desafiados com PbCl<sub>2</sub>.



**Gráfico 3: Locomoção dos náuplios nos diferentes tratamentos.** Os valores representam média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% para a média. Houve efeito significativo do número de parada dos náuplios do grupo “branco” em relação aos demais tratamentos, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ( $F_{(6; 21; 93)} = 33,447$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,392$ ). Os pressupostos do teste foram respeitados e foi necessário a retirada de um outlier. O pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ) indicou diferenças no número de parada dos náuplios dos poços “branco” em relação ao demais tratamentos.

Além disto, pode-se observar que a locomoção dos náuplios é diretamente proporcional ao número de paradas, assim como mostra o gráfico 4.



**Gráfico 4: Relação da locomoção dos náuplios com o número de paradas.** Foi observado correlação positiva entre a locomoção dos náuplios e o número de paradas deles, segundo teste de correlação de Pearson ( $r = 0,993$ ,  $p < 0,0001$ ). Verificou-se que quanto mais os náuplios se locomoveram, maior foi o número de paradas realizado.

### 5.3. Análise físico-química da água por MEV-EDS

As placas analisadas em MEV-EDS foram a placa 3 (lua cheia) e a placa 36 (lua minguante). Não foi observada presença de chumbo no sedimento sólido extraído da água, em nenhuma das placas. Os principais elementos químicos identificados foram carbono, oxigênio, sódio, silício e cloro tanto na placa 3 quanto na placa 36, assim como mostram as tabelas 4 e 5, respectivamente. Outros elementos cuja quantidade não foi significativa (traços) não foram representados.

**Tabela 4. Principais elementos encontrados na placa 3 através de EDS (porcentagem de átomos pela área analisada).** Média dos valores em triplicata.

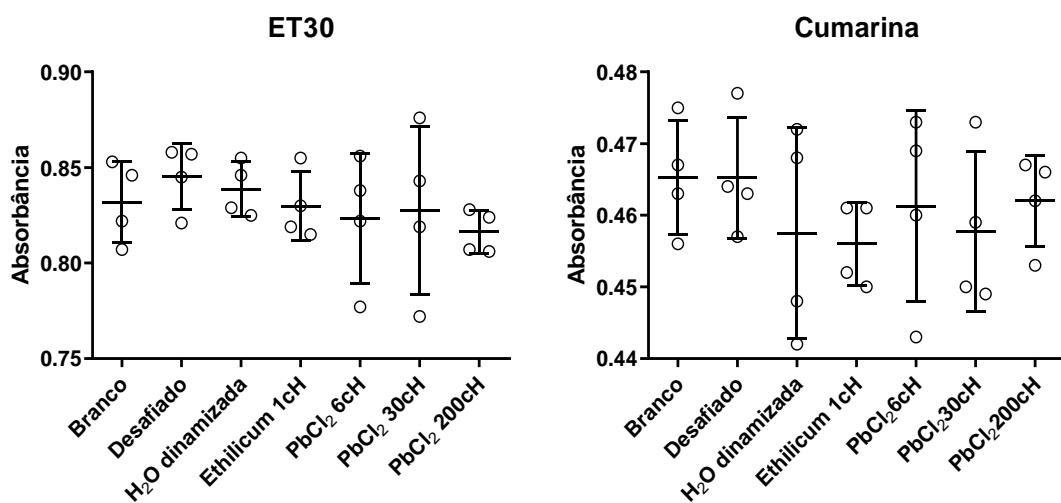
	Placa 3				
	Carbono	Oxigênio	Sódio	Silício	Cloro
<b>Branco</b>	8,95	44,49	12,45	14,81	13,47
<b>Desafiado</b>	5,96	44,08	11,45	14,39	12,41
<b>H<sub>2</sub>O dinamizada</b>	2,43	49,84	12,39	16,76	11,58
<b>Ethilicum 1cH</b>	3,30	49,94	11,46	18,79	9,64
<b>PbCl<sub>2</sub> 6cH</b>	10,21	43,08	11,89	15,09	12,95
<b>PbCl<sub>2</sub> 30cH</b>	8,75	45,84	10,73	13,47	13,72
<b>PbCl<sub>2</sub> 200cH</b>	3,33	47,86	12,51	18,61	11,00

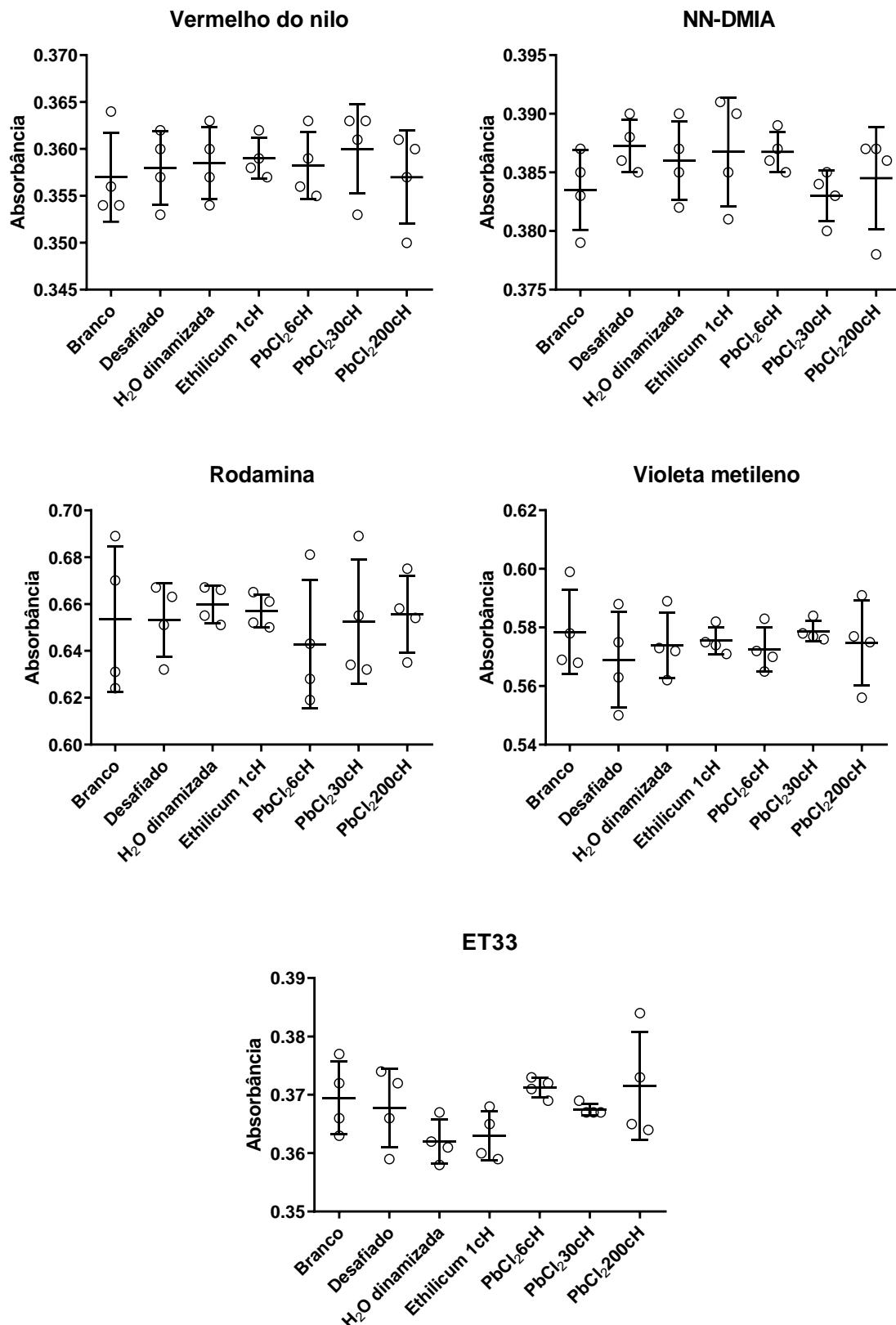
**Tabela 5. Principais elementos encontrados na placa 36 através de EDS (porcentagem de átomos pela área analisada).** Média dos valores em triplicata.

Placa 36					
	Carbono	Oxigênio	Sódio	Silício	Cloro
<b>Branco</b>	4,68	43,07	10,66	10,75	13,34
<b>Desafiado</b>	3,06	50,00	11,36	15,67	12,25
<b>H<sub>2</sub>O dinamizada</b>	10,11	44,89	11,87	16,16	11,03
<b>Ethilicum 1cH</b>	7,68	47,04	11,54	17,43	10,16
<b>PbCl<sub>2</sub> 6cH</b>	2,98	49,85	11,89	17,82	10,47
<b>PbCl<sub>2</sub> 30cH</b>	5,01	47,44	11,13	16,12	10,39
<b>PbCl<sub>2</sub> 200cH</b>	2,03	51,06	12,21	18,00	10,33

#### 5.4. Análise de espectrometria pelo método Cartwright

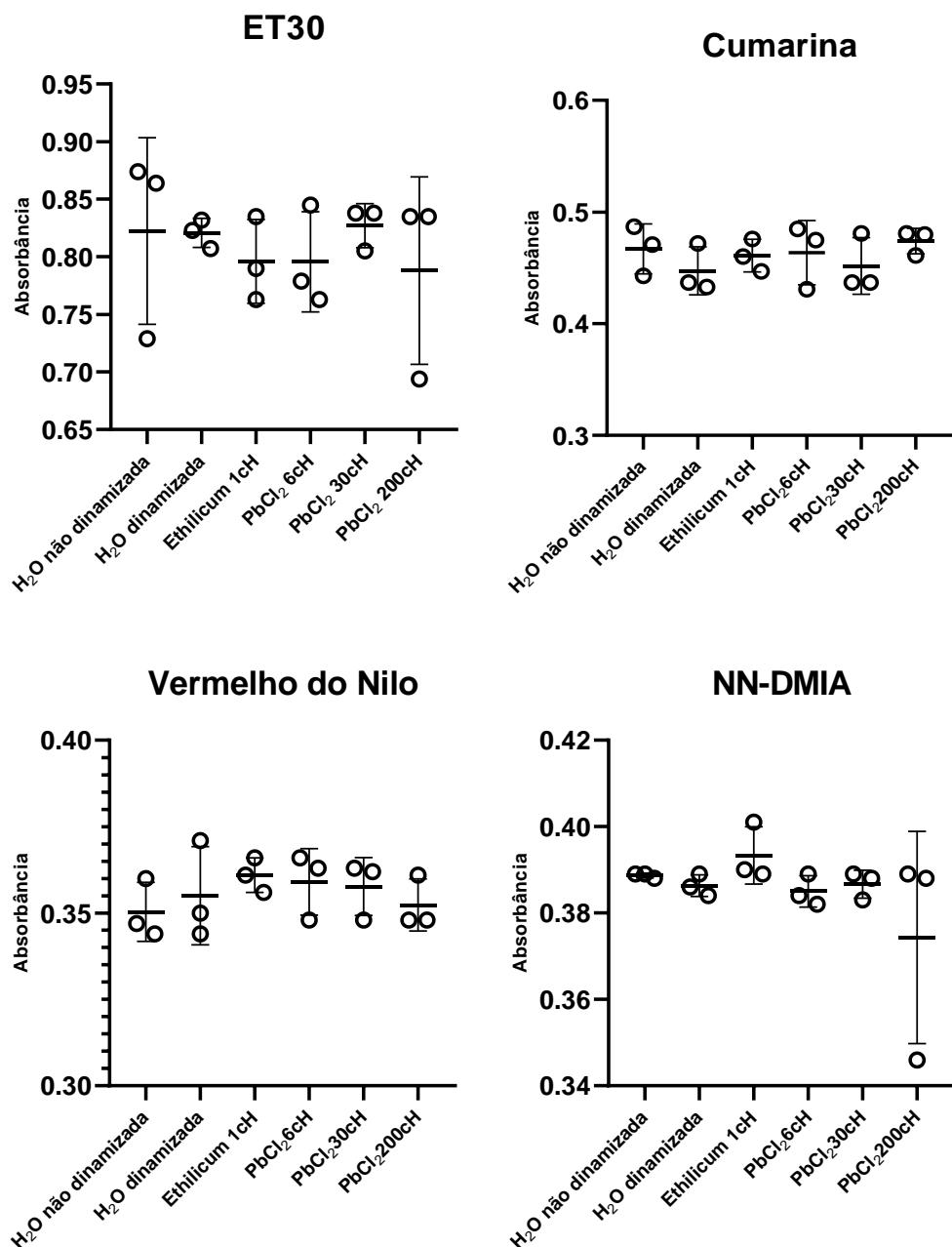
A análise por método Cartwright foi feita a partir do material recolhido das placas 4 (lua cheia), 14 (lua nova), 26 (lua crescente) e 35 (lua minguante). Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, em nenhum dos 7 corantes utilizados (gráfico 10). A absorbância dos corantes também não apresentou diferenças significativas entre os medicamentos testados. Dentre os medicamentos estão água não dinamizada, água dinamizada, *Ethilicum 1cH*, PbCl<sub>2</sub> 6cH, PbCl<sub>2</sub> 30cH, PbCl<sub>2</sub> 200cH (gráfico 11).

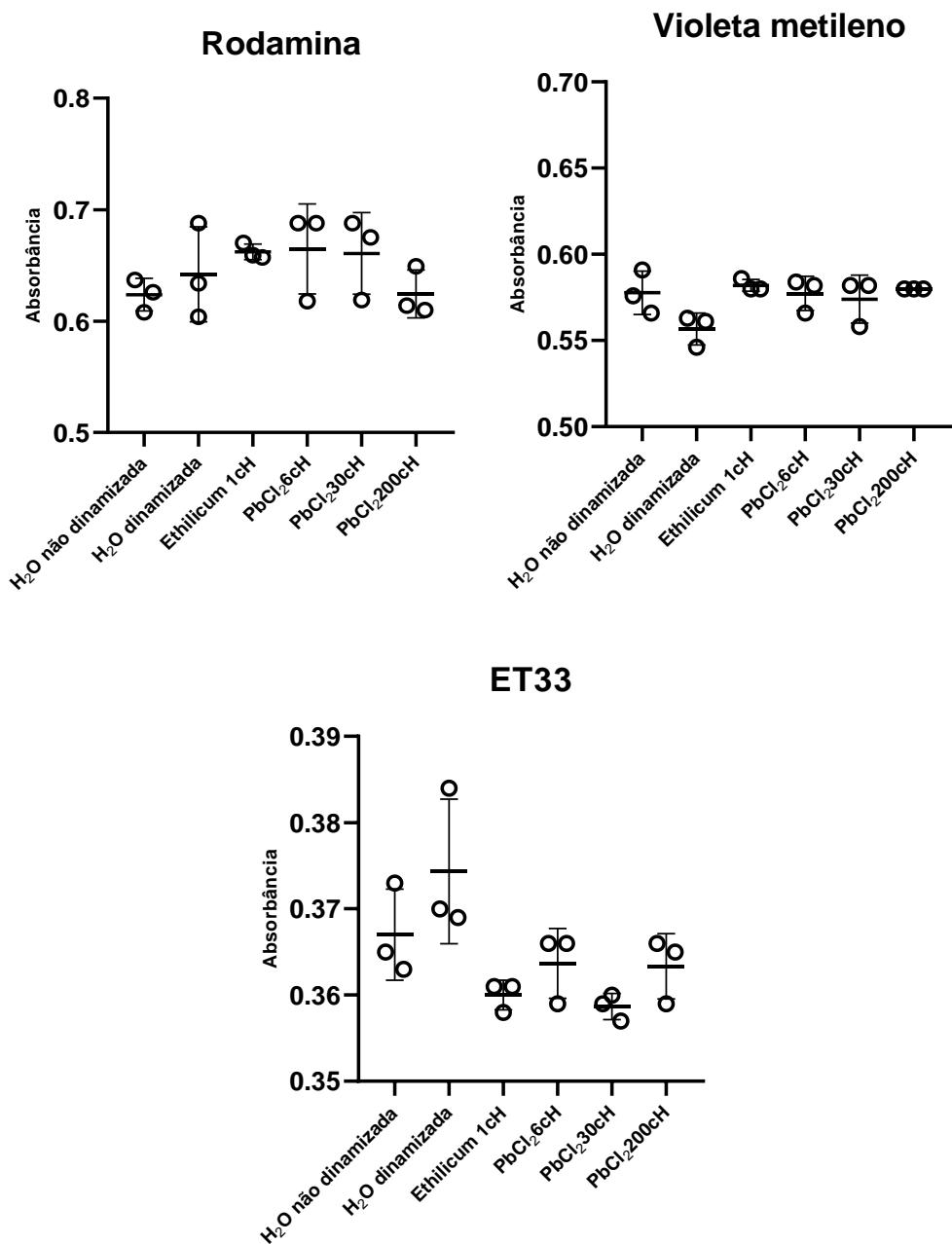




**Gráfico 10: Absorbância dos corantes ET30, cumarina, vermelho do Nilo, NN-DMIA, rodamina, violeta metileno e ET 33 nos diferentes tratamentos.** Os valores representam a triplicata de cada amostra, sendo média ± intervalo de confiança de 95%.

Os valores compreendem a média de todas placas selecionadas, em todas as fases lunares. Segundo ANOVA de dois fatores, não houve efeito significativo do tratamento sobre os valores de absorbância do ET30 ( $F_{(6; 18)} = 0,548$ ,  $p = 0,765$ ,  $\eta^2 = 0,142$ ), da cumarina ( $F_{(6; 18)} = 0,517$ ,  $p = 0,788$ ,  $\eta^2 = 0,135$ ), do vermelho do Nilo ( $F_{(6; 18)} = 0,279$ ,  $p = 0,939$ ,  $\eta^2 = 0,071$ ) do NN-DMIA ( $F_{(6; 18)} = 1,011$ ,  $p = 0,449$ ,  $\eta^2 = 0,221$ ), da rodamina ( $F_{(6; 18)} = 0,260$ ,  $p = 0,949$ ,  $\eta^2 = 0,071$ ), do violeta ( $F_{(6; 18)} = 0,415$ ,  $p = 0,859$ ,  $\eta^2 = 0,096$ ) e do ET 33 ( $F_{(6; 18)} = 2,628$ ,  $p = 0,052$ ,  $\eta^2 = 0,361$ ).





**Gráfico 11: Absorbância dos corantes ET30, cumarina, vermelho do Nilo, NN-DMIA-DMIA, rodamina, violeta metileno e ET 33 nos diferentes medicamentos.** Os valores representam a triplicata de cada amostra, sendo média ± intervalo de confiança de 95%. Os valores compreendem a média da triplicata dos medicamentos. Segundo ANOVA de um fatores, não houve efeito significativo dos medicamentos sobre os valores de absorbância do ET30 ( $F_{(5; 12)} = 0,302$ ,  $p = 0,902$ ,  $\eta^2 = 0,111$ ), da cumarina ( $F_{(5; 12)} = 0,632$ ,  $p = 0,679$ ,  $\eta^2 = 0,208$ ), do vermelho do Nilo ( $F_{(5; 12)} = 0,578$ ,  $p = 0,716$ ,  $\eta^2 = 0,194$ ) do NN-DMIA ( $F_{(5; 12)} = 1,054$ ,  $p = 0,431$ ,  $\eta^2 = 0,305$ ), da rodamina ( $F_{(5; 12)} = 1,178$ ,  $p = 0,375$ ,  $\eta^2 = 0,329$ ), do violeta metileno ( $F_{(5; 12)} = 2,787$ ,  $p = 0,067$ ,  $\eta^2 = 0,537$ ) e do ET 33 ( $F_{(5; 12)} = 4,268$ ,  $p = 0,0184$ ,  $\eta^2 = 0,640$ ).

Foi encontrada diferença estatística entre os medicamentos ao serem testados com o corante ET33, mais especificadamente entre a água dinamizada e o *Ethilicum 1cH* e a água dinamizada e o  $\text{PbCl}_2$  30cH, confirmado pelo pós-teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a biologia da *Artemia salina* e sobre parâmetros físico-químicos da água foram abordados em quatro etapas: 1) a avaliação da taxa de eclosão em placa de 96 poços nas 4 fases da lua; 2) a avaliação da mobilidade e número de paradas dos náuplios ecloididos na lua cheia; 3) análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) de amostras colhidas na lua cheia e na lua minguante; 4) análise, pelo método de Cartwright, da reatividade dos isoterápicos e da água submetida aos diferentes tratamentos a corantes solvatocrônicos, no intuito de identificar mudanças no comportamento dipolo do solvente. Amostras de água colhidas nas 4 fases da lua foram analisadas.

A avaliação da taxa de eclosão mostra um efeito claro da intoxicação *per se*, no sentido de aumentar a taxa de eclosão e tal efeito foi mais evidente na lua cheia. A análise global dos dados, comparando-se apenas as fases da lua independente dos tratamentos, mostrou que a menor taxa de eclosão ocorreu na lua crescente. Tais variações são de certa forma esperadas pois crustáceos são sensíveis às variações lunares, mesmo sob luz artificial (66, 67) Em trabalhos anteriores utilizando o mesmo modelo experimental, a modulação dos efeitos da intoxicação com cloreto de mercúrio, CL 10 sobre a eclosão de cistos em função da fase da lua, também foi observada, com predomínio das eclosões na lua cheia (68), o que corrobora os dados registrados nesse estudo.

Sabe-se que os cistos são formas de resistência da *Artemia salina* (30-34), logo, entende-se que o retardo na eclosão representa efeito protetor frente à presença de agentes tóxicos na água. Tal efeito foi observado em todos os grupos tratados com preparações sucussionadas ou submetidas à agitação vertical ritmada, independente do material de partida conter cloreto de chumbo ou não. O fato da água sucussionada promover *per se* esse efeito inespecífico de proteção sobre a eclosão sugere relação com nano e microbolhas de ar que se formam durante a agitação e/ou à presença de radicais de hidroxila carreados em grande quantidade por tais estruturas (9-11). Em contato com nanobolhas, a porosidade da matéria expande completamente, modificando características

com fluidez, temperatura e densidade, o que pode modificar diversas funções celulares (69 - 71).

A inserção de preparações submetidas à sucussão correspondeu a 5% do volume total do poço, o que sugere a propagação de novas bolhas pelo “bulk” de água contida nos poços. Esse efeito propagatório é bem conhecido, levando-se em conta das propriedades termodinâmicas das nanobolhas (72).

Os efeitos da água sucussionada *per se* já foram descritos na literatura anteriormente. Um estudo feito por Nagai et al. (2019) com o objetivo de verificar se macrófagos infectados com o fungo *Encephalitozoon cuniculi* poderiam mudar de fenótipo após o tratamento com diferentes potências de *Phosphorus*, mostrou o aumento da produção da citocina RANTES, atividade lisossômica e redução da apoptose das células infectadas (73). Efeitos inespecíficos também foram observados apenas com o veículo (água sucussionada), sendo evidente a diferença entre ambas as situações.

Na avaliação de mobilidade dos náuplios, demonstrou-se que os náuplios controle, não submetidos a nenhum desafio ou tratamento, apresentaram atividade geral menor em comparação aos náuplios intoxicados com  $PbCl_2$ . Assim sendo, além de aumentar a taxa de eclosão, a intoxicação produziu mudanças comportamentais, sugerindo efeitos neurotóxicos, mesmo que em baixas concentrações (CL 10). Efeitos neurotóxicos do chumbo são conhecidos e descritos em várias espécies (52-55), incluindo invertebrados (74). Neste caso, nenhum efeito protetivo foi observado nos diferentes tratamentos. As diferenças de efeitos entre os estágios de desenvolvimento da *Artemia salina*, nesse caso, sugerem ação localizada das nanobolhas e da oxidação do chumbo impedindo diretamente a ruptura da parede do cisto, sem que houvesse mudança efetiva na biodisponibilidade do chumbo dissolvido na água, como seria esperado caso o efeito protetor fosse evidente também na fase seguinte (fase naupiliar).

Não foram encontrados traços de  $PbCl_2$  nos precipitados da água do mar exposta aos diferentes tratamentos, sugerido não haver efeito quelante associado. Os principais elementos encontrados nas amostras e detectados por EDS foram: carbono, oxigênio, sódio, silício e cloro e todos esses elementos apresentam porcentagens semelhantes nos diferentes tratamentos. Estudos

mais específicos sobre esse aspecto, utilizando métodos mais sensíveis de detecção de chumbo (metálico e solúvel) são necessários em etapas futuras.

O uso de corantes solvatocrônicos como ferramenta preditiva da atividade biológica das preparações ultra diluídas e de potências homeopáticas tem sido consolidado nos últimos anos. Esse método, desenvolvido por Steven Cartwright, acusa mudanças de carga no solvente onde cada corante foi diluído, o que produz variações na absorbância durante a leitura em espectrofotômetro. Tais oscilações são muito sensíveis às variações de diluições homeopáticas (75 - 77). A reatividade específica da água sucussionada ao ET33, seguida de ausência de reatividade entre as preparações isoterápicas específicas e os demais corantes solvatocrônicos, reforçam, mais uma vez a especificidade dos efeitos da sucussão em si sobre a eclosão dos cistos.

Esse resultado complementa os demais resultados, onde na eclosão, pode-se dizer que a água sucussionada conferiu certa proteção aos cistos. Estudo mais aprofundados e métodos mais sensíveis devem ser elaborados no futuro, para a confirmação de tais hipóteses. Da mesma forma, à semelhança do que foi observado em estudos prévios (78), a extensão da pesquisa para outras potências de  $PbCl_2$  merecem estudos futuros, para rastreio de possíveis efeitos específicos.

## 7. CONCLUSÃO

A intoxicação de cistos de *Artemia salina* por PbCl<sub>2</sub> CL 10 em placa produz maior eclosão de cistos e maior atividade geral de náuplios em seus estágios iniciais de desenvolvimento até 48 horas. Preparações submetidas à sucussão, inclusive a água purificada, têm efeitos protetores sobre a intoxicação, sendo tais efeitos mais evidentes na lua cheia.

Nenhum efeito biológico específico das preparações isopáticas de PbCl<sub>2</sub> (isoterápicos) testadas nesse estudo foi observado, incluindo a reatividade das potências aos corantes solvatocrônicos.

Conclui-se que o efeito observado na taxa de eclosão se deu pela água sucussionada em si, não havendo interferência de nenhuma das potências testadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Bonamin LV. A Solidez da Pesquisa Básica em Homeopatia. *Revista de Homeopatia* 2017; 80: 89-97.
- 2 - Teixeira MZ. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. *Rev Med (São Paulo)*. 2006; 85(2):30-43.
- 3 - Santanna C, Heington EA, Junges JR. Prática médica homeopática e a integralidade. *Interface (Botucatu)*. 2008; 12(25): 233-246.
- 4 - Bonamin LV. *Discovering How Homeopathy Works*. Kindle-Amazon. 101pp. 2018.
- 5 - Endler PC, Bellavite P, Bonamin L, Jäger T, Mazon S. Replications of fundamental research models in ultra-high dilutions. 1994 and 2015–update on a bibliometric study. *Homeopathy* 2015; 104(4): 234-45. doi: 10.1016/j.homp.2015.10.003.
- 6 – Lopes CR, Falkowski GJ, Brustolin CF, Massini PF, Ferreira ÉC, Moreira NM, Aleixo DL, Kaneshima EN, Araújo SM. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy*. 2016; doi: 10.1016/j.homp.2015.09.005.
- 7 - Carneiro MTPG *et al*. Efeito de medicamentos homeopáticos. *Revista de Homeopatia* 2011; 74(1/2): 9-32.
- 8 - Bagai U, Walter NS. Antiplasmodial potential of homeopathic drugs Chelidonium and nosode against *Plasmodium berghei* infection. *J Complement Integr Med*. 2014; Sep;11(3):195-201. doi: 10.1515/jcim-2013-0006.
- 9 - Fontes, OL. Farmácia homeopática: teoria e prática. São Paulo, 4<sup>a</sup> edição, editora Manole Ltda, 2013.
- 10 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Homeopática Brasileira. 3<sup>a</sup> edição. Brasília: ANVISA, 2011a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-homeopatica>
- 11 - Amaral, MTCG. O preparo de medicamentos homeopáticos na forma líquida – gotas de A a Z. Portal da homeopatia, São Paulo, 2012.

12 - Dutra, VC. Farmacotécnica homeopática. Rede de tecnologia e inovação do Rio de Janeiro, REDETEC, 2011. 33p.

13 - Almeida, JD, Arisawa, EAL, Lima, AP, Rocha, RF, Carvalho, YR. Estudo do efeito do plumbum metallicum 30ch na reparação óssea em mandíbulas de ratos sem barreira mecânica. *Dental Science*, 2006; 9(1): 69-76, doi: <https://doi.org/10.14295/bds.2006.v9i1.278>

14 - Padilha RQ, Riera, R, Átallah, AN. Homeopathic Plumbum metallicum for lead poisoning: a randomized clinical trial. *Homeopathy*. 2011; 100(3):116-21. doi: 10.1016/j.homp.2010.11.007.

15 - Bagot, JL. Using Hetero-Isotherapics in Cancer Supportive Care: The Fruit of Fifteen Years of Experience. *Homeopathy*, 2016; 105(1):119-25.

16 - Mitidiero, AMA. Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. 2002. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade de Santa Catarina, Santa Catarina, 2002.

17 - Agarwal A, Ng WJ, Lui Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. *Chemosphere* 2011; 84: 1175-1180.

18 - Cartwright SJ. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. *Homeopathy* 2016; 105(1):55-65. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.002.

19 - Bevilacqua AHV, Suffredini IB, Bernardi MM. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro. *Rev Inst Ciênc Saúde*. 2008; 26(2):157-60.

20 - An HJ, Sarkheil M, Park HS, Yu IJ, Johari SA. Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2019; 218:62-69.

21 - Danabas D, Ates M, Tastan BE, Cimen ICC, Unal I, Aksu O, Kutlu B. Effects of Zn and ZnO Nanoparticles on *Artemia salina* and *Daphnia magna* Organisms: Toxicity, Accumulation and Elimination. *Science of The Total Environment*, 2020; 711, 134869. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134869>.

22 - Mohiseni M, Farhangi M, Agh N, Mirvaghefi A, Talebi K. Toxicity and Bioconcentration of Cadmium and Copper in Artemia Urmiana Nauplii. *IJT*. 2017; 11 (1): 33-41.

23 - Madhav MR, David SEM, Kumar RSS, Swathy JS, Bhuvaneshwari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of Artemia salina. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017; 52:227-238.

24 - Zagatto P.A.; Bertolleti E.B Aquatic ecotoxicology–principles and applications. RiMa, São Carlos-Brasil, 2008. 472p.

25 - Camara MR, Castro EV. *Artemia Salina* L. (Anostraca): uma opção para a aquicultura do Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 1982; 1: 145-147.

26 - Harzsch S, Glötzner J. An immunohistochemical study of structure and development of the nervous system in the brine shrimp *Artemia salina* LINNAEUS, 1758 (Branchiopoda, Anostraca) with remarks on the evolution of the arthropod brain. *Arth Struc Dev.*, 2002; 30: 251-270.

27 - Abatzopoulos TJ, Beardmore J, Clegg JS, Sorgeloos P. (Ed.). *Artemia: basic and applied biology*. Dordrecht, Springer. 1a ed. Reprint. 2010. 304p.

28 - Yin F. Lipid metabolic response, peroxidation, and antioxidant defence status of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus*, fed with highly unsaturated fatty acids enriched Artemia nauplii. *J World Aquac Soc.*, v.43, p:716-726, 2012.

29 - Schatzer CAF. Efeitos da exposição a Fotoprotetores em Artemia salina Leach: Estudo ecotoxicológico e comportamental. Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência da Fundação Universidade Federal do ABC. Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência. Santo André, 2019. 117p.

30 - Amarante CB. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amaz.*, 2011; 41: 431-434.

31 - Tan J, MacRae TH. Stress tolerance in diapausing embryos of *Artemia franciscana* is dependent on heat shock factor 1 (Hsf1). *PLoS ONE*. 2018; 13(7): e0200153.

32 - Alcarde AR, Basso LC. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Sci. agric.* 1997; (54): 189-194.

33 – Werner ET, Lima ABP, Amaral JAT. Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2012, 8 (14): 552.

34 - Macrae TH. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. *Cell Stress and Chaperones*. 2016; 21: 9–18.

35 – Fox HM. Lunar periodicity in reproduction, *Proc. Biol. Sci.* 1932; 95 (1924): 523–550.

35 - Arliss JM, Kaplan EN, Galvin SL. The effect of the lunar cycle on frequency of births and birth complications. *Am J Obst Gynecol*, 2005; 192: 1462-1464.

36 – Hartland-Rowe, R. Lunar Rhythm in the Emergence of an Ephemeropteran. *Nature* 176, 657 (1955). <https://doi.org/10.1038/176657a0>

37 – Macdonald WW. Observations on the Biology of Chaoborids and Chironomids in Lake Victoria and on the Feeding Habits of the Elephant-Snout Fish' (*Mormyrus kanume* Forsk.) *Journal of Animal Ecology*. Vol. 25, No. 1 (May, 1956), pp. 36-53. doi: 10.2307/1849

38 – Corbet PS. Lunar periodicity of aquatic insects in Lake Victoria, *Nature*. 1958; 182: 330–331.

39 - Barletta-Bergan A, Barletta M, Saint-Paul U. Community structure and temporal variability of ichthyoplankton in North Brazilian mangrove creeks. *Journal of Fish Biology* 2002; 61: 33–51 (a).

40 - Barletta-Bergan A, Barletta M, Saint-Paul U. Structure and seasonal dynamics of larval fish in the Caeté River Estuary in North Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2002; 54: 193–206 (b).

41 - Lima ARA, Barletta M, Costa MF, Ramos JAA, Dantas DV, Melo PAMC, Justino AKS, Ferreira GVB. Changes in the composition of ichthyoplankton assemblage and plastic debris in mangrove creeks relative to moon phases. *Journal of Fish Biology.* 2016; 89: 619–640.

42 - Marinho EN, França FC, Santos GS, Barbosa DHF, Filho JMS, Palhares MS, Lopes EP, Viana WS, Esquarcio LMG, Valle GR. The lunar cycle influences differently the birth moment in mares according to foal sex. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2015; 39 (2): 296-300.

43 – Silveira FL. As variações dos intervalos de tempo entre as fases principais da Lua. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 2001; 23(3): 300-307.

44 – Silveira FL. As Variações dos Intervalos de Tempo entre as Fases Principais da Lua. *Rev. Bras. Ensino Fís.* 2001; 23 (3): 300-307.

45 – Silveira FL. Marés, fases principais da Lua e bebês. *Caderno Brasileiro de Ensino de Física.* 2003; 20 (1): 10-29.

46 - Darroz LM, Rosa CTW, Vizzotto PA, Rosa AB. As fases da lua e os acontecimentos terrestres: a crença de diferentes níveis de instrução. *Revista Latino-Americana de Educação em Astronomia - RELEA*, n.16, p.73-85, 2013.

47 – Sousa HÁ, Roeser HMP, Matos AT. Métodos e técnicas aplicados na avaliação ambiental do aterro da BR-040 da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte - MG. *Rem: Rev. Esc. Minas, Ouro Preto.* 2002; 55 (4): 291-300.

48 - Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, et al. Lead exposure and cardiovascular disease-a systematic review. *Environ Health Perspect.* 2007; 115:472–482.

49 - Nriagu JO. Lead and lead poisoning in antiquity. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1983. 437p.

50 - Wani AA, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 2015; 8:55–64.

51 - Russel, JB. Química Geral vol.1, São Paulo: Pearson Education do Brasil, Makron Books, 1994. MAHAN, Bruce M.; MYERS, Rollie J.; Química: um curso universitário, Ed. Edgard Blucher LTDA, São Paulo/SP – 2002.

52 - Yuan W, Yang N, Li X. Advances in Understanding How Heavy Metal Pollution Triggers Gastric Cancer. Review Article. BioMed Research International; 2016: ID 7825432.

53 - Banfalvi, G, Sarvari A, Nagy G. Chromatin changes induced by Pb and Cd in human cells. *Toxicology in Vitro*. 2012; 26 (6): 1064–1071.

54 – Jesus LDF. Avaliação dos níveis de chumbo e mercúrio em população exposta ambientalmente na Região Centro-oeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 2018; 34 (2): e00034417.

55 - Souza ID, Andrade AS, Dalmolin RJS. Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. *Crit Rev Toxicol*. 2018 May;48(5):375-386. doi: 10.1080/10408444.2018.1429387.

56 - Bosso ST, Enzweiler J. Ensaios para determinar a (Bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. *Quím. Nova* 2008; 31 (2): 394-400.

57 - Pfadenhauer LM, Burns J, Rohwer A. A protocol for a systematic review of the effectiveness of interventions to reduce exposure to lead through consumer products and drinking water. *Syst Rev*. 2014 Apr 15;3:36. doi: 10.1186/2046-4053-3-36.

58 - Moreira FR, Moreira JC. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15(2):119–29.

59 - Laws EA. Aquatic pollution: an introductory. *Aquatic Ecology*, 4<sup>th</sup> Edition, April 2017, 760p.

60 - Mitra P, Sharma S, Purohit P, Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. Nov-Dec 2017;54(7-8):506-528. doi: 10.1080/10408363.2017.1408562.

61 - Gillis BS, Arbieva Z, Gavin IM. Analysis of lead toxicity in human cells. July 2012, *BMC Genomics* 13(1):344. doi: 10.1186/1471-2164-13-344

62 - Obeng-Gyasi, E. Sources of lead exposure in various countries. *Rev Environ Health* 2019; 34(1): 25–34.

63 - Alloway, BJ. Heavy metals in soils. New York: John Wiley, 1990, 339p.

64 – Melo VF. Chumbo e zinco em águas e sedimentos de área de mineração e metalurgia de metais. *Quím. Nova*. 2012; 35 (1): 22-29.

65 - Paiva AC. Dispersão do chumbo em ambientes aquáticos da região de Belo Jardim. 2009, 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

66 - Ugolini A, Boddi V, Mercatelli L, Castellini C. Moon orientation in adult and young sandhoppers under artificial light. *Proc Biol Sci*. 2005; 272(1577):2189-94.

67 - Ugolini A, Hoelters LS, Ciofini A, Pasquali V, Wilcockson DC. Evidence for discrete solar and lunar orientation mechanisms in the beach amphipod, *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Sci Rep*. 2016; 6: 35575. doi: 10.1038/srep35575.

68 – Bonamin LV. Homeopathy and Environmental Challenges. *Homeopathy* 2020; 109 (1): A1-A28 doi: 10.1055/s-0040-1702061. Oral Abstracts.

69 - Meegoda JN, Hewage SA, Batagoda JH. Stability of nanobubbles. *Langmuir*. 2019; 35 (37), 12100-12112. doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01443

70 - Leon A, Perera R, Hernandez C, Cooley M, Jung O, Jeganathan S, Abenojar E, Fishbein G, Sojahrood AJ, Emerson CC, Stewart PL, Kolios MC, Exner AA. Contrast enhanced ultrasound imaging by nature-inspired ultrastable echogenic nanobubbles. *Nanoscale*. 2019; doi: 10.1039/c9nr04828f.

71 - Shang H, Wu B, Liang X, Sun Y, Han X, Leizhang, Wang Q, Cheng W. Evaluation of therapeutic effect of targetingnanobubbles conjugated with NET-1 siRNA by shear wave elastography: an in vivo studyof hepatocellular carcinoma bearing mice model. *Drug Delivery*. 2019; doi:10.1080/10717544.2019.16674

72 - Lombard J, Biben T, Merabia S. Nanobubbles around plasmonic nanoparticles: Thermodynamic analysis. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2015; 91(4):043007.

73 – Nagai, MY, Dalboni, LC, Cardoso, TN, Correia, MS, Pinto, SAG, Pinto, AAG, Coelho, CP, Alvarez-Saraiva, A, Perez, GB, Lallo, MA, Bonamin, LV. Effects of Homeopathic Phosphorus on Encephalitozoon

cuniculi-Infected Macrophages In-Vitro. *Homeopathy* 2019;108:188–200. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678700>.

74 - Li WH, Shi YC, Tseng IL, Liao VH. Protective efficacy of selenite against lead-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62387. doi: 10.1371/journal.pone.0062387.

75 - Cartwright SJ. Interaction of homeopathic potencies with de the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchsone. Part 1: pH studies. *Homeopathy*. 2017; 106(1):37-46. doi: 10.1016/j.homp.2017.01.001.

76 - Cartwright SJ. Degree of Response to Homeopathic Potencies Correlates with Dipole Moment Size in Molecular Detectors: Implications for Understanding the Fundamental Nature of Serially Diluted and Succussed Solutions. *Homeopathy*. 2018; 107(1):19-31. doi: 10.1055/s-0037-1617448.

77 - Cartwright SJ. Homeopathic Potencies May Possess an Electric Field(-like) Component: Evidence from the Use of Encapsulated Solvatochromic Dyes. *Homeopathy*. 2020; 109(1):14-22. doi: 10.1055/s-0039-1693985.

78 - Bonamin LV, Pedro RRP, Mota HMG, Aguiar MSC, Pinto SAG, de Souza J, de Oliveira LHS, Aparicio AC, Peres GB, Suffredini I, Dutra-Correia M, Cartwright SJ. Characterization of Antimonium crudum Activity Using Solvatochromic Dyes. *Homeopathy*. 2020; 109(2):79-86. doi: 10.1055/s-0039-1697000.