

UNIVERSIDADE PAULISTA

**EFEITO PROTETOR DO ISOTERÁPICO SOBRE A
ECLOSÃO DE CISTOS DE *Artemia salina* INTOXICADAS
COM ARSENIATO DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção de título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

EDNAR DO NASCIMENTO COIMBRA MELO

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE PAULISTA

**EFEITO PROTETOR DO ISOTERÁPICO SOBRE A
ECLOSÃO DE CISTOS DE *Artemia salina* INTOXICADAS
COM ARSENIATO DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção de título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof^a Dr^a Leoni Villano Bonamin.

EDNAR DO NASCIMENTO COIMBRA MELO

SÃO PAULO

2020

Melo, Ednar do Nascimento Coimbra.

Efeito protetor do isoterápico sobre a eclosão de cistos de *Artemia salina* intoxicadas com arseniato de sódio / Ednar do Nascimento Coimbra Melo. - 2020.

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

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Ecotoxicologia e inovações terapêuticas.

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

1. Arsênio. 2. Homeopatia. 3. Bioresiliência. 4. Bioremediação.
5. Fases da Lua. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Título.

EDNAR DO NASCIMENTO COIMBRA MELO

**EFEITO PROTETOR DO ISOTERÁPICO SOBRE A
ECLOSÃO DE CISTOS DE *Artemia salina* INTOXICADAS
COM ARSENIATO DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção de título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Prof.^a Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dra. Adriana Ramos de Miranda
IPEN – Universidade de São Paulo - USP

Prof.^a Dra. Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista - UNIP

Prof^o Dr. Geovani Bravin Peres
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dra. Carla Holandino Quaresma
Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiro que tudo, sem ELE nada sou... por estar sempre presente na minha vida, minha fortaleza, que me levanta tantas vezes... minha eterna gratidão! “Não importa quem chegou primeiro... e sim os que vieram pra ficar”

A minha orientadora Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin pela paciência, dedicação, disponibilidade, pelo aprendizado, enfim ... por tornar coisas tão complexas em singelas! Sua simplicidade, inteligência, bondade me encantam! Agradeço a Deus todos os dias ter colocado você na minha vida! Receba minha profunda admiração e gratidão!

Aos meus pais, José Coimbra (*in memoriam*) e Maria do Carmo Coimbra, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui... minha base! Sem vocês ao meu lado nada faria sentido! Obrigada! A vocês meu amor incondicional!

Aos meus filhos Karine, Diego, Davi e Daniela, presentes que Deus me deu! Meus tesouros! Obrigada por compreenderem minha ausência, tantas vezes! Pelo apoio diário, pelo incentivo, companheirismo! Gratidão por existirem na minha vida! Vocês são meus “*tudo*”! Amo infinitamente vocês!

Ao meu genro Axel, que com suas habilidades de professor, sempre esteve disponível para me ajudar. Minha profunda admiração e gratidão! A minha nora Tamires, sempre prestativa e muito presente nas nossas vidas! O amor e amizade que construímos, vai além do tempo! Amo vocês!

A toda minha família, tão importantes na minha vida, em especial minha irmã Edlane, que sempre me incentiva, me faz rir... amo vocês!

Às amigas e amigo que me acolheram em São Paulo, especialmente Andreia, Sandra, Suham, Mirian e Adalberto, que tanto me ajudaram neste projeto! Sem vocês eu certamente não conseguiria! Vocês são irmãos que a vida me deu!

Aos professores Maristela, Ivana, Giovanni, recebam meu respeito e gratidão por toda a ajuda prestada na execução desse projeto.

Àquele que já partiu, mas esteve sempre presente nesta fase da minha VIDA, me apoiando e amando incondicionalmente... minha gratidão eterna!

Aos funcionários da UNIP, meus amigos, Wilton, Michele, Cleide, Suzana, Jefferson, obrigada pela paciência e por dedicarem seu tempo na execução desse trabalho.

À Direção do Hospital Universitário de Maceió – AL, instituição onde trabalho, por conceder minha liberação para cursar este Doutorado, em especial meu amigo Humberto Belmino, por todo o apoio recebido.

A você meu amigo Alagoano Iramirton! Você me ensinou a chegar até aqui!

A todas as pessoas que fazem direta ou indiretamente parte da minha vida!

À Farmácia HN Cristiano, na pessoa da Dra. Amarilys Toledo César, pela manipulação das matrizes dos isoterápicos e ao Prof. Jasper Zanco pela padronização do uso do Image J Plug-in Trackmate para as análises comportamentais.

Ao programa de financiamento de bolsas da Universidade Paulista - UNIP e à CAPES – PROSUP por me proporcionar esta experiência de aprendizado.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais. A você paizinho lindo, que não teve a oportunidade de estudar porque logo cedo precisou trabalhar, mas dentro da sua simplicidade não mediu esforços pra investir na minha educação e fazer parte de todos os meus projetos. Pai que saudade! Sei que onde você estiver continua a me proteger! A você minha mãezinha querida, guerreira, mulher de fé, incentivadora, que sempre me apoia em tudo! Meu ombro amigo, minha fortaleza! E que nunca mediu esforços pra defender seus filhos! A vocês meu amor e infinita gratidão! Amo muito vocês!

“Nós podemos sempre mais do que imaginamos”

MADRE AGATHE VERHELLE

RESUMO

AUTORA: EDNAR DO NASCIMENTO COIMBRA MELO

Introdução: Os oceanos são receptores finais de contaminantes, os quais geram danos ao ecossistema marinho. Os metais pesados, quando lançados no meio ambiente, podem intoxicar todos os níveis da cadeia alimentar. Em homeopatia, isoterápicos são utilizados para tratamento de intoxicações, mas pouco se sabe sobre seu uso como remediadores ambientais. Paralelamente, a *Artemia salina* é um microcrustáceo muito utilizado como modelo em ensaios ecotoxicológicos. **Objetivo:** Verificar os efeitos de isoterápicos em *Artemia salina* exposta a diferentes concentrações de arseniato de sódio (AS), segundo variações ambientais, como as fases lunares. **Metodologia:** O AS foi utilizado nas concentrações de 6.0 mg/mL, 3.0 mg/mL e 1.5 mg/mL. Os tratamentos com isoterápico (*Arsenicum*) nas potências 6, 30 e 200 cH foram feitos no momento da inserção dos cistos na água do mar, em placas de 96 poços. Os controles foram: cistos não desafiados, tratados com água, água sucussionada e com veículo. Os registros das atividades dos náuplios foram realizados após 24 e 48 horas, por fotografia e filmagem digitais. Análises do sedimento mineral obtido de um *pool* de amostras de água foram realizadas em EDS acoplado a MEV. A concentração de arsênio solúvel foi medida por ICP/OES utilizando o mesmo *pool*. Os tratamentos com isoterápicos e veículo foram realizados em cego. Alterações no momento dipolo da água foram verificadas utilizando corantes solvatocrômicos. Os períodos lunares observados corresponderam à Lua crescente (11 a 17 de fevereiro de 2019) e à “superlua” (18 a 24 de fevereiro de 2019). **Resultados e discussão:** A taxa eclosão dos cistos aumentou após a exposição ao AS de forma concentração-dependente durante a Lua crescente e os tratamentos com isoterápicos reverteram esse efeito. Não houve efeito concentração-dependente do AS durante a “superlua”. Na Lua crescente, todas as potências do isoterápico reduziram a taxa de eclosão ($p < 0.002$) e houve maior precipitação de arsênio com menor concentração de arsênio solúvel nas amostras desafiadas com 6.0 mg/mL e tratadas com *Arsenicum* 30 cH. Alterações da mobilidade dos náuplios não foram observadas. A viabilidade dos náuplios após a eclosão foi reduzida após a exposição ao AS de forma concentração-dependente ($p < 0.0001$), independente da fase da Lua e sem efeito dos isoterápicos. O corante ET 33 mostrou ser o melhor indicador de atividade para todas as potências de *Arsenicum* e para amostras de água tratadas com *Arsenicum* 6 cH. O corante vermelho do Nilo mostrou interação com *Arsenicum* 6 cH e com a água tratada com a mesma potência. **Conclusão:** A toxicidade do AS em *Artemia salina* foi concentração-dependente, mas esse efeito foi anulado na “superlua”. Na Lua crescente, os isoterápicos em diferentes potências revertem a toxicidade do AS sobre a eclosão dos cistos, mas não modificam a viabilidade. Somente a potência 30 cH parece modificar a solubilidade do arsênio na água. A interatividade dos corantes solvatocrômicos ET 33 e vermelho do Nilo com *Arsenicum* sugere mecanismos associados a variações específicas do momento dipolo da água, em função da potência utilizada.

Palavras-chave: Arsênio, homeopatia, bioresiliência, bioremediação, fases da Lua.

ABSTRACT

AUTHOR: EDNAR DO NASCIMENTO COIMBRA MELO

Introduction: The oceans are final recipients of contaminants, which damage the marine ecosystem. Heavy metals, when released to the environment, can poison all levels of the food chain. In homeopathy, isotherapies are used to treat poisoning, but little is known about their use as environmental remediators. At the same time, *Artemia salina* is a microcrustacean widely used as a model in ecotoxicological tests. **Objective:** To verify the effects of isotherapies on *Artemia salina* exposed to different concentrations of sodium arsenate (AS) in function of environmental variations, such as lunar phases. **Methodology:** AS was used at concentrations equal to 6.0 mg / mL, 3.0 mg / mL and 1.5 mg / mL. The treatments with isotherapeutic (*Arsenicum*) in potencies 6, 30 and 200 cH were made at insertion of the cysts in seawater, in 96-well plates. The controls were: non-challenged cysts, cysts treated with water, suction water or vehicle. The records of nauplii activities were performed after 24 and 48 hours, by digital photography and filming. Analyzes of the mineral sediment obtained from a *pool* of water samples were performed in EDS coupled to SEM. The concentration of soluble arsenic was measured by ICP / OES using the same *pool*. The treatments with isotherapies and vehicle were carried out blind. Changes in the dipole moment of water were verified using solvatochromic dyes. The lunar periods observed corresponded to the crescent moon (11 to 17 February 2019) and the “supermoon” (18 to 24 February 2019). **Results and discussion:** The hatching rate of the cysts increased after exposure to AS in a concentration-dependent manner during the crescent moon, and treatments with isotherapies reversed this effect. There was no concentration-dependent effect of AS during the “supermoon”. In the crescent moon, all potencies of isotherapies reduced the hatching rate ($p < 0.002$) and there was a greater arsenic precipitation with lower concentration of soluble arsenic in the samples challenged with 6.0 mg / ml and treated with *Arsenicum* 30 cH. Changes in the mobility of nauplii were not observed. The viability of nauplii after hatching was reduced after exposure to AS in a concentration-dependent manner ($p < 0.0001$), regardless of the moon phase and without effects of isotherapies. The ET 33 dye proved to be the best activity indicator for all potencies of *Arsenicum*, and for water samples treated with *Arsenicum* 6 cH. The red Nile dye showed interaction with *Arsenicum* 6 cH and with water treated with the same potency. **Conclusion:** The toxicity of AS in *Artemia salina* was concentration-dependent, but this effect was canceled out in the “supermoon”. In the crescent moon, isotherapies in different potencies reverse the toxicity of AS on the outbreak of the cysts, but do not modify the viability. Only the 30 cH potency seems to modify the solubility of arsenic in water. The interactivity of solvatochromic dyes ET 33 and Nile red with *Arsenicum* suggests mechanisms associated to specific variations in the dipole moment of water, in function to the used potency.

Keywords: Arsenic, homeopathy, bioresilience, bioremediation, moon phases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arsênio no meio ambiente: fontes naturais e antropogênicas.....	20
Figura 2 - Biotransformação do arsênio no organismo.....	23
Figura 3 - Metilação do DNA e Arsênio	25
Figura 4 - Unhas de "Mees - Aldrich" no arsenicismo.	26
Figura 5 - Lesões cutâneas mais frequentes no arsenicismo.	27
Figura 6 - Mecanismo proposto para carcinogênese por arsênio.	29
Figura 7 - Prováveis efeitos genéticos induzidos pelo arsênio.....	29
Figura 8 - Escala centesimal de Hahnemann.	34
Figura 9- Modelo de estrutura da rede de ligação de hidrogênio nas moléculas de água.	42
Figura 10 - Mecanismo do salto ou "jumping protônico"	46
Figura 11 - Diferenças entre macrolhas, microlhas e nanolhas.	48
Figura 12 - Comportamento de uma substância coloidal no meio líquido.....	49
Figura 13 - Tipos de nanolhas.....	50
Figura 14 - Diferentes métodos que possibilitam o estudo das nanolhas. ...	51
Figura 15 - Colapso de uma nanolha.	52
Figura 16- Modelo envolvendo diversas teorias sobre memória da água.	55
Figura 17 - Cisto, estágio guarda-chuva e náuplio recém-eclodido.	56
Figura 18 - Ciclo de vida da <i>Artemia salina</i>	57
Figura 19 - Representação esquemática da casca do cisto da <i>Artemia salina</i> .58	
Figura 20- Formação do "escudo molecular" pelas proteínas LEA.	60
Figura 21 - Cistos da <i>Artemia</i> : agentes estressores e mecanismos envolvidos na diapausa.....	61
Figura 22- Fases da Lua.	63
Figura 23- Princípios de funcionamento do espectrofotômetro.	66
Figura 24- Espectrofotômetro e corante ET33.	67
Figura 25- Placa de 6 poços com lamínulas metalizadas para análise em MEV-EDS.....	81
Figura 26- MEV: Imagem de sedimento produzido a partir de amostra de água tratada com <i>Arsenicum</i> 6 cH.	82
Figura 27- Lua cheia normal x "superlua".	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente.....	22
Tabela 2- Estudo piloto: concentrações de arseniato de sódio após diluição da solução "mãe".	72
Tabela 3- Estudo piloto (1) protocolo CL 10: viabilidade dos náuplios.....	73
Tabela 4- Estudo piloto (2) protocolo CL 10: Novo desenho experimental	74
Tabela 5- Estudo piloto (2) CL 10: Percentual médio de viabilidade.....	75
Tabela 6- Cronograma da elaboração das placas e fases da Lua.	76
Tabela 7- Número de cistos (N) por placa, período de 24 horas, Lua crescente.	78
Tabela 8- Número de cistos (N) por placa, período de 24 horas, Lua cheia. ...	79
Tabela 9- Corantes usados para análise de espectrofotometria pelo método Cartwright.....	84
Tabela 10- MEV-EDS: Percentual As precipitado na água no desafio de 6,0 mg/mL.	95
Tabela 11- Concentração de arsênio solúvel na água do mar, em função do tratamento e fase da Lua.	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Efeito dos diferentes desafios com AS sobre a taxa de eclosão relativa na Lua Crescente - 24 horas.	87
Gráfico 2- Efeito dos diferentes desafios com AS sobre a taxa de eclosão relativa na “superlua”, 24 horas.....	87
Gráfico 3- Efeito dos tratamentos e desafios, na eclosão relativa dos cistos, Lua crescente - 24 horas.	88
Gráfico 4- Efeito interação tratamentos e desafios sobre a taxa de eclosão relativa, Lua crescente - 24 horas.....	89
Gráfico 5- Efeito interação tratamentos e desafios sobre a taxa de sobrevivência relativa, Lua crescente - 24 horas.	91
Gráfico 6- Efeito dos tratamentos sobre a taxa de sobrevivência relativa, Lua crescente - 24 horas.	92
Gráfico 7- Efeito entre tratamentos e fase da Lua em relação a taxa de sobrevivência relativa, 24 horas.	93
Gráfico 8- Mobilidade e número de paradas relativas de náuplios após 48 horas, nos diferentes tratamentos.....	94
Gráfico 9- Mobilidade e número de paradas relativas de náuplios após 48 horas, nos diferentes desafios.	94
Gráfico 10- Porcentagem de As por amostra, identificado por EDS, após desafio com 6,0 mg/mL AS.	96
Gráfico 11- Percentual de arsênio precipitado na água x concentração de arsênio solúvel.	99
Gráfico 12- Concentração de arsênio solúvel em todos os grupos desafiados com 6,0 mg/mL de AS.....	99
Gráfico 13- Variações de absorvância em corantes solvatocrômicos, responsivos a diferentes potências de isoterápicos, Lua crescente, desafio com 6,0 mg/mL AS.....	101
Gráfico 14- Variações de absorvância em corantes solvatocrômicos responsivos a diferentes amostras de água do mar tratadas com potências de isoterápicos, Lua crescente, desafio com 6,0 mg/mL AS.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

As	Arsênio
AS	Arseniato de sódio
As V	Arseniato de sódio pentavalente
Ars	Arsenicum album
<i>Arsenicum</i>	Preparado isopático do arseniato de sódio
As III	Arsenito de sódio trivalente
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
atm	Unidade para medir pressão atmosférica
ATP	Adenosina tri-fostato
ASIIIMT	Metiltransferase do arsênio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CL	Concentração letal
°C	Graus celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
g/mol	Grama/mol
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O	Molécula de água
H ⁺	Íon hidrogênio
IL	Interleucinas
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
KHz	Kilohertz – unidade para expressar frequência de ondas
L	Litro
mg	Miligramas
mm	Milímetros
MHz	Megahertz - unidade para expressar frequência de ondas
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa β
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
UV – VIS	Ultravioleta e visível
RPM	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TNF α	Fator de necrose tumoral
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	15
1.2	SOBRE O ARSÊNIO	15
1.2.1	TOXICOCINÉTICA DO ARSÊNIO	22
1.2.2	TOXICIDADE DO ARSÊNIO	26
1.3	HOMEOPATIA: FUNDAMENTOS E ASPECTOS ATUAIS	31
1.3.1	CONCEITOS GERAIS DE HOMEOPATIA	31
1.3.2	SOBRE A ISOTERAPIA	36
1.3.3	ASPECTOS ATUAIS DA PESQUISA BÁSICA EM HOMEOPATIA: HIPÓTESES SOBRE A TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO.....	38
1.3.3.1	BIOSEMIÓTICA.....	40
1.3.3.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE A ÁGUA	40
1.3.3.3	HIPÓTESE: CLUSTERS DE ÁGUA.....	42
1.3.3.4	HIPÓTESE: MEMÓRIA ELETROMAGNÉTICA DA ÁGUA	44
1.3.3.5	HIPÓTESES: NANOESTRUTURAS E NANOBOLHAS	46
1.4	O MODELO DA <i>Artemia salina</i>	54
1.4.1	ANATOMIA DO CISTO.....	58
1.4.2	DIAPAUSA.....	58
1.5	CICLO DE VIDA DO ANIMAL MARINHO E FASES DA LUA.....	62
1.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS	64
1.6.1	MEV – EDS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X	64
1.6.2	ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	65
1.6.3.	ESPECTROFOTOMETRIA COM CORANTES SOLVATOCRÔMICOS 66	
2	OBJETIVOS.....	68
2.1	GERAIS.....	68
2.2	ESPECÍFICOS	68
3	JUSTIFICATIVA	69
4	MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.1	PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DOS ISOTERÁPICOS.....	69
4.2	PREPARO DOS ISOTERÁPICOS DE TRABALHO	70
4.3	CODIFICAÇÃO DOS FRASCOS	71
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	71

4.4.1	ECLOSÃO DOS CISTOS E VIABILIDADE DOS NÁUPLIOS	71
4.4.1.1	PREPARO DA ÁGUA MARINHA ARTIFICIAL, DO ALIMENTO E CULTIVO DA <i>Artemia salina</i>	71
4.4.1.2	DEFINIÇÃO DO PERCENTUAL DA CONCENTRAÇÃO LETAL.....	72
4.4.1.3	PROTOCOLO PARA PREPARO DAS PLACAS TESTE	75
4.4.1.4	ANÁLISE DAS PLACAS	77
4.4.1.5	PARÂMETROS ANALISADOS PARA DEFINIÇÃO DA TAXA DE ECLOSÃO E VIABILIDADE DOS NÁUPLIOS.....	78
4.4.2	ANÁLISE DA MOBILIDADE DOS NÁUPLIOS.....	79
4.4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA	80
4.4.3.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS): MEV-EDS.....	80
4.4.3.2	ANÁLISE DO ARSÊNIO SOLÚVEL NA ÁGUA.....	82
4.4.3.3	ESPECTROFOTOMETRIA COM CORANTES SOLVATOCRÔMICOS.	83
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
5	RESULTADOS.....	85
5.1.	ANÁLISES DAS PLACAS DE 96 POÇOS.....	85
5.2.	ANÁLISE DA ECLOSÃO DOS CISTOS EM FUNÇÃO DAS FASES DA LUA E DOS TRATAMENTOS	86
5.3	ANÁLISE DA VIABILIDADE: LUA CRESCENTE EM 24 HORAS	90
5.4	ANÁLISE DA MOBILIDADE: LUA CRESCENTE	93
5.5	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DESCRITIVA DA ÁGUA POR MEV-EDS	94
5.6	ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO SOLÚVEL PELO MÉTODO ICP/OES.....	96
5.7	ANÁLISE DE ESPECTROFOTOMETRIA PELO MÉTODO CARTWRIGHT.....	100
6.	DISCUSSÃO.....	103
7.	CONCLUSÕES.....	111

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

A poluição ambiental decorre de qualquer atividade capaz de causar danos ao meio ambiente, ao interferir no equilíbrio dos ecossistemas trazendo consequências nocivas aos seres vivos¹.

Os oceanos representam 71% da superfície da terra e 97% dos recursos hídricos do planeta e funcionam como receptores finais de contaminantes, ocasionando danos à saúde do ambiente, desenvolvimento de doenças e agravos aos seres vivos. Tudo isso se expressa pelo crescimento da mortalidade de espécies marinhas, pela toxicidade cumulativa de alguns contaminantes ao longo da cadeia alimentar e aumento na degradação de áreas de importância ambiental como manguezais e corais. Todos estes fatores contribuem para o desequilíbrio dos ecossistemas¹.

Dados publicados pela Agência Ambiental das Nações Unidas (ONU Meio Ambiente) em 2017 apontam para o efeito devastador da poluição ambiental, com 80% do esgoto mundial sendo despejado no meio ambiente sem tratamento². Um estudo publicado em 2018 pela revista *The Lancet - Commission on Pollution and Health*, confirmou que a poluição química constitui a maior causa ambiental de doença e morte prematura no mundo, atingindo principalmente países de baixa e média renda como o Brasil³.

Os metais pesados encontrados na natureza são muito utilizados pelas indústrias e seus resíduos, quando lançados no meio ambiente, podem ser absorvidos por vegetais e animais, causando intoxicações em todos os níveis da cadeia alimentar. No organismo, ao serem absorvidos, ligam-se facilmente às proteínas e enzimas provocando graves intoxicações, podendo levar à morte. Os metais pesados mais tóxicos para os seres vivos são: mercúrio, chumbo, cromo, cádmio, arsênio e manganês⁴.

1.2 SOBRE O ARSÊNIO

Na idade média o arsênio (As) foi muito utilizado como veneno, em virtude de seu aspecto inofensivo (pó branco) e leve sabor adocicado, por isso era

facilmente adicionado aos alimentos. Os sintomas da intoxicação simulavam outras doenças, que progrediam para a morte. O uso terapêutico do arsênio data de 400 a.C. Hipócrates, Aristóteles, Dioscórides e Plínio, já o empregavam em diversas doenças⁵. Os compostos arsenicais atingiram seu auge no uso como medicamentos entre o fim do século XIX e meados do século XX, na terapêutica de várias doenças, como dermatoses em geral, psoríase, sífilis, malária, coréia, epilepsia, asma, entre outras⁵. Após ser constatada sua intensa toxicidade, principalmente relacionada ao aparecimento de diversas neoplasias, seu uso na prática médica ficou restrito a algumas doenças específicas. Atualmente, o trióxido de arsênio (TRISENOX) ainda é empregado no tratamento da leucemia promielocítica aguda⁵. O melarsoprol é o arsênico trivalente formado a partir da junção do óxido de melarsen ao 2,3-dimercaptopropinol⁶, sendo utilizado há várias décadas no tratamento da tripanossomíase humana africana (conhecida como doença do sono), causada pelo *Trypanosoma brucei*^{7,8,9}. Como todo derivado organoarsênico, pode ser muito tóxico e com frequência ocorrem reações adversas. É eliminado na forma de metabólito ativo, sendo 80% excretado pelas fezes⁶. Mais recentemente, outros quimioterápicos derivados do arsênio foram propostos para o tratamento do câncer de pulmão, colo uterino e carcinoma hepatocelular¹⁰.

Antineoplásicos são medicamentos usados no tratamento do câncer, que produzem resíduos tóxicos com risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente¹¹. Os quimioterápicos interferem diretamente no DNA das células e podem produzir efeitos citotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos de forma que, ao serem introduzidos no ecossistema, são responsáveis por sérios danos aos organismos ali presentes¹¹. Geralmente esses fármacos são inseridos no meio ambiente através das excretas dos pacientes, mas também devido ao descarte inadequado dos medicamentos vencidos e das embalagens utilizadas na administração da medicação^{11,12}. Um fato preocupante é que muitos hospitais não tratam previamente esses resíduos, os quais são conduzidos por seus efluentes para as estações de esgoto e lançados nos corpos hídricos, cujos processos de degradação podem levar de dias até anos^{11,12}. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que para cada ano no período de 2020 a 2022, 10.810 novos casos de leucemia estão previstos no Brasil¹³. Tal suposição alerta para a possibilidade desses micropoluentes

(inclusive o As encontrado no quimioterápico TRISENOX¹⁴) alcançarem mais facilmente ambientes aquáticos e o solo¹³.

Vários estudos apontam para a presença de metais pesados em medicamentos usados na Medicina Ayurvedica, principalmente chumbo, mercúrio e arsênio, em doses possivelmente tóxicas. Este sistema medicinal teve origem na Índia há mais de 4.000 anos e até os dias atuais é amplamente utilizado nas práticas médicas¹⁵. Nos últimos anos, houve aumento no consumo destes medicamentos em países da América do Norte, Europa e América do Sul, devido a facilidade em adquiri-los, principalmente pela internet¹⁶. Os medicamentos Ayurvedicos são elaborados a partir de plantas e alguns são acrescidos de metais pesados processados, para anular ou atenuar seus efeitos tóxicos¹⁷. São empregados em várias doenças de pele, infecciosas, neurológicas, cefaléias e até mesmo neoplasias¹⁶. Na literatura Ayurvedica não há relatos de intoxicação descritos após as formulações serem purificadas. Mas diversas pesquisas detectaram a presença de metais pesados nestes medicamentos, com riscos potenciais à saúde¹⁶. Panda e colaboradores avaliaram as três espécies de arsênio utilizadas no preparo de medicamentos da Medicina Ayurvedica e concluíram que duas (Manashila e Gauripasana) podem apresentar importantes efeitos cardiotoxicos, dentre outros. Assim entende-se que a quantidade do metal na solução não é *per se* suficiente para avaliar sua segurança, pois fatores como biodisponibilidade, espécie de arsênio e o risco- benefício do tratamento devem ser também observados¹⁷.

A Medicina Tradicional Chinesa também utiliza fitoterápicos que podem estar contaminados com metais pesados, provenientes da poluição da água ou do solo. Como a grande maioria das ervas não apresentam padronização, o controle de qualidade é duvidoso e, portanto, estas não são isentas de efeitos colaterais¹⁸. O ácido arsênico, conhecido como Pi-shuang ou *Arsenicum sublimatum*, é utilizado na forma de pó para o tratamento da malária, asma, úlceras, sífilis, disenteria, dentre outras¹⁹.

O arsênio faz parte da farmacopéia homeopática, na forma de ácido arsênico ultradiluído e dinamizado denominado *Arsenicum album*. Foi um dos primeiros medicamentos utilizados por Samuel Hahnemann, médico e criador da Homeopatia e tem ação em vários órgãos, sendo recomendado para tratamento de doenças agudas e crônicas envolvendo os sistemas digestório,

nervoso, gênito-urinário e respiratório, bem como afecções dermatológicas e vários sintomas mentais²⁰. Contudo, é considerado um remédio seguro quando em preparações ultradiluídas.

A partir do século passado, insumos contendo organoarsênicos pentavalentes foram introduzidos na agricultura e agropecuária, com várias finalidades. Na avicultura, foi adicionado às rações para tratar ou prevenir doenças parasitárias, promover crescimento mais rápido e realçar a coloração da carne²¹. Mas tais compostos reduzem a taxa de mortalidade por interferir na regulação de genes ligados a imunidade²². O Roxarsone e seu metabólito acertasone são os compostos arsenicais mais utilizados desde a década de 1940 como aditivos na alimentação de aves (frangos e perus) e, em menor proporção, na ração de porcos²³. Há relatos na literatura da presença de As em vários tecidos de frangos de corte que receberam esse tipo de suplementação⁷. Em 90% das vezes, são excretados sem apresentar alteração na sua forma química^{24,25}. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, proibiu desde 2002 o uso de medicamentos contendo As como aditivos na alimentação de animais²⁶. O FDA (*Food and Drugs Administration*), aboliu essas substâncias desde 2014, por reconhecer que o consumo de frangos alimentados com esses aditivos poderia causar câncer nos consumidores²⁷. Mas países como China e Índia, que contemplam aproximadamente 36% da população global, ainda utilizam organoarsênicos na avicultura²¹. Dados do *Institute for Agriculture and Trade Policy* (EUA) identificaram altas concentrações de As em produtos alimentícios de grandes redes de *fast foods* (hamburguer, frango empanado, sanduíches), cujas aves receberam alimentos enriquecidos com compostos organoarsenicais²⁸. Outrossim, com frequência tem-se detectado diferentes espécies de arsênio no solo, causado pelo uso de esterco de frango utilizado como fertilizante na agricultura²⁸. Todos esses fatos indicam a importância da toxicidade do As e seus efeitos na saúde humana e animal.

O consumo de arroz cultivado em áreas irrigadas por águas subterrâneas contaminadas com arsênio tem sido associado a casos de neoplasias, a depender da quantidade e da frequência com que esse alimento é ingerido²⁹. Em contrapartida, a fauna e flora marinha (várias algas e crustáceos) podem conter compostos organoarsênicos em pequenas quantidades, na sua grande maioria a arsenobetaína, bem menos tóxica que as formas inorgânicas³⁰.

Através da cadeia alimentar podem chegar ao consumo humano, porém sem causar danos à saúde.

Nos últimos anos aventou-se a possibilidade do arsênio ser um elemento essencial para animais e seres humanos. Alguns autores consideram como valores de normalidade níveis de arsênio no sangue até $5,1 \mu\text{L}^{31}$, outros no máximo $10 \mu\text{L}$, em populações não expostas ao As^{32,33,34}. Alimentos, principalmente frutos do mar (na forma de arsenobetaína, menos tóxica), grãos (mais frequente o arroz) e bebidas (habitualmente a água, a depender da região) contribuem para manutenção desses valores³⁵. Diante disso, é questionado se o arsênio pode ser um constituinte normal de biomoléculas. Alguns organismos unicelulares utilizam o arsênio em reações de oxirredução para gerar energia^{36,37,38}. Há relatos do uso do arsênio para favorecer o crescimento de animais de criação, como roedores, cabras, porcos, aves. Talvez o arsênio esteja relacionado a reações bioquímicas próprias do metabolismo da metionina nestes animais^{34,36,37}, porém, sob o ponto de vista biológico, prevalece sua ação essencialmente tóxica, mesmo em pequenas concentrações, com efeitos comprovadamente carcinogênicos. O arsênio pode alterar a estrutura de várias proteínas e enzimas, alterar suas funções ou até mesmo suprimir ações fundamentais na manutenção de diversos processos celulares fisiológicos^{31,39,40}. Portanto, essa dualidade entre ser essencial e tóxico vai depender da espécie, periodicidade e quantidade, a qual o indivíduo foi exposto^{31,35}.

Quimicamente, o arsênio é classificado como um metaloide, de número atômico 33, com massa atômica 75. Pertence ao grupo 15 da tabela periódica e apresenta propriedades intermediárias entre metais e não-metais^{41,42}. É um elemento que faz parte da natureza, está amplamente distribuído na crosta terrestre, no solo, em muitos tipos de rochas e pode estar combinado a outros elementos como oxigênio, cloro e enxofre, formando arsênio ou trióxido de arsênio. Alcança a água, o ar e a terra, através da poeira soprada pelo vento, e contamina a água por escoamento e lixiviação⁴³. Em condições naturais, o arsênio encontra-se mais concentrado nas águas subterrâneas e sedimentos nos fundos de lagos ou rios⁴¹.

É emitido para o meio ambiente como resultado de atividade vulcânica, usinas termoelétricas de carvão e rejeitos de minérios⁴¹ (Figura 1). No meio industrial é muito utilizado nas fundições de chumbo, ouro, prata, cobre, zinco e

cobalto, estando relacionado ao prurido arsenical ou prurido dos fundidores (*smelter's itch*) devido ao contato com o trióxido de arsênio⁵. Atualmente, 90% da forma inorgânica é usada como conservante para madeira, mas também é utilizado no processo de fabricação de vidros, ligas metálicas de chumbo e latão (baterias para automóveis), conservantes de couro, dentre outros⁴¹. Ao se combinar com carbono e hidrogênio, em animais e plantas, compostos de arsênio orgânico são formados, sendo usados principalmente na composição de pesticidas ou como aditivos na alimentação animal^{41,42}.

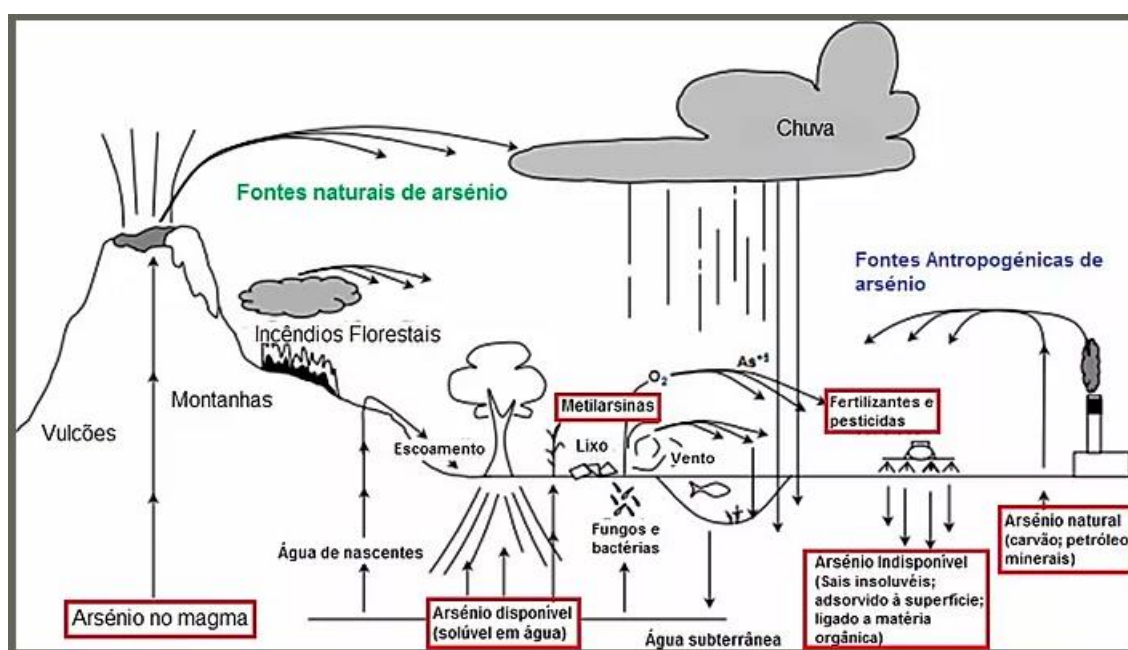


Figura 1. Arsênio no meio ambiente: fontes naturais e antropogênicas

Retirado de: <https://arsenioldc1516.wixsite.com/arsenio>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a exposição humana ao arsênio é mais comum pelo consumo de água contaminada. Este órgão recomenda que a água potável não deve conter mais de 10 partes por bilhão de arsênio. Outras fontes de exposição podem ser alimentos contaminados e ocupação profissional. Estudos ambientais apontam as atividades de mineração como as mais propícias para contaminar águas superficiais e subterrâneas^{44,45}. Casos graves de intoxicação ocorreram em Bangladesh e Índia onde, em 1993, descobriu-se que mais de 90% das águas dos poços estavam contaminadas e

que apenas 10% da população recebia água encanada⁴⁰. América Latina, México, Chile e Argentina também foram locais de contaminação acidental pelo arsênio. No Brasil, foram registradas contaminações por arsênio no meio ambiente nas regiões de Nova Lima, Ouro Preto, Mariana e áreas circunvizinhas, nas águas do Rio das Velhas e outros aquíferos, resultantes da intensa exploração dos minérios^{40,45}.

Meharg et al, 2009^{46,47} projetaram os riscos de desenvolver câncer pelo consumo de arroz contaminado com arsênio. Para isso analisaram a quantidade de arsênio total em amostras de grãos de arroz provenientes de dez países de quatro continentes. O arroz compreende a maior parte da alimentação dos povos asiáticos. Utilizando uma modelagem proposta pela *United States Environmental Protection Agency*, a qual prevê um aumento na incidência de câncer a partir da ingestão diária de arsênio inorgânico no arroz ⁴⁸ (3,67 mg/kg/dia) e, baseado no cálculo de um consumo fixo de 100 g de arroz por dia em um indivíduo pesando 60 kg, esse risco traduziu-se nas seguintes taxas médias: Bangladesh (22 em 10.000 pessoas); China (15 em 10.000 pessoas); Índia (7 em 10.000 pessoas); Itália e EUA (~1 por 10.000 pessoas). Concluíram que a chance de desenvolver neoplasias por exposição crônica ao As nesses países é cerca de 200, 150 e 70 vezes maior em Bangladesh, China e Índia, respectivamente, em relação ao risco previsto pela OMS (1 em 100.000 pessoas). Dessa forma, o arroz contaminado com arsênio seria um risco potencial à saúde para a população do Sul e Sudeste da Ásia, particularmente Bangladesh e Bengala Ocidental.

Na atmosfera, as principais formas encontradas são As elementar e trióxido de As⁵. O arsenito (arsênio trivalente – As III) é mais solúvel e cerca de 60 vezes mais tóxico que compostos de arseniato (As V - forma oxidada pentavalente). A arsenobetaína e arsenocolina, por sua vez, não são tóxicas⁴¹.

As principais espécies encontradas no meio ambiente estão descritas na Tabela 1. Essas informações são importantes porque o efeito tóxico das espécies de arsênio depende da sua forma química^{40,48}.

Tabela 1. Principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente (Adaptada de Tonietto, 2005)⁵

Composto	Abreviatura	Fórmula Química
Arsenito	As (III)	AsO ₃ ³⁻
Arsenato	As (V)	AsO ₄ ³⁻
Ácido monometilarsenoso	MMA (III)	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido monometilarsínico	MMA (V)	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido dimetilarsenoso	DMA (III)	(CH ₃) ₂ AsOH
Ácido dimetilarsínico	DMA (V)	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Arsenocolina	AsC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
Arsenobetaína	AsB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COO ⁻
Arsina e derivados	AsH ₃ , MeAsH ₂ , Me ₂ AsH	(CH ₃) ^x AsH ^{3-x} (x = 0-3)
Ácido fenil arsênico	PAA	C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂

Retirado de: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/10019/10019_5.PDF

Devido à sua toxicidade, frequência e potencial para exposição humana, o arsênio é considerado o elemento químico mais perigoso da *Priority List of Hazardous Substances* de 2017, da *Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act*, de acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) dos Estados Unidos⁴¹. É considerado extremamente tóxico, mesmo em baixas concentrações, pois é bioacumulativo. Os efeitos nocivos produzidos por este metal dependem da espécie, da dose, frequência e da via de exposição. Indivíduos não expostos podem apresentar normalmente arsênio na urina na concentração de 0,02 mg por litro, proveniente da dieta. Nas intoxicações, os valores urinários de arsênio nos casos agudos estão entre 1 a 2 mg/L e nos crônicos acima de 1 mg/L de urina^{40,45}.

1.2.1 TOXICOCINÉTICA DO ARSÊNIO

A intoxicação decorre da ingestão, inalação ou absorção do arsênio. Os compostos de arsênio inorgânico são absorvidos 75% pela via oral (através da água e alimentos contaminados) e, numa menor proporção, também pela pele^{5,41}. Podem ultrapassar a barreira placentária e serem encontrados no leite materno. Em relação ao As orgânico os estudos em humanos são escassos^{49,50}.

Ao ser introduzido no organismo humano, o As é rapidamente convertido em espécies tóxicas e distribuído de maneira uniforme para diferentes órgãos do corpo. Pode inibir enzimas que contêm grupos sulfidrilas e a síntese de ATP, afetando o metabolismo energético, glicídico e lipídico. Os arsenatos são parcialmente reduzidos a arsenitos e, no sangue, a maioria se liga aos eritrócitos⁴².

No sangue dos seres humanos o As apresenta meia vida de 2 horas, e nos eritrócitos seu nível chega a ser 3 vezes mais alto que no plasma³⁴. Por ordem de afinidade, o As se deposita nos seguintes tecidos: fígado, rins, músculos, coração, baço, pâncreas, pulmões, cérebro (cerebelo > tecido encefálico), pele, cabelos e unhas⁵¹.

A principal reação metabólica que ocorre no organismo é a metilação do As inorgânico e a saturação desse mecanismo no organismo depende da dose do arsênio absorvido (Figura 2). A forma de metabolizar o As decorre do polimorfismo genético de cada indivíduo exposto, implicando diretamente no tipo e extensão dos efeitos adversos da intoxicação^{49,50}.



Figura 2. Biotransformação do arsênio no organismo

Reações de oxirredução e metilação integram o processo de biotransformação do As inorgânico nos humanos, animais e microorganismos. Inicialmente, o arseniato (As V) ao adentrar o organismo, é reduzido a arsenito (As III), por meio de oxidação da glutathione em dissulfeto de glutathione^{34,51}. Proteínas ligantes se acoplam ao arsenito para retardar sua permanência e acúmulo nos tecidos. Posteriormente, tornam-se saturadas e tem início o processo de metilação^{34,40}. O principal órgão onde ocorre a metilação é o fígado,

mas a depender da espécie química do As, pode haver participação dos rins nesse processo⁵¹. A atividade das metiltransferases (enzimas que catalisam a adição do grupo metil proveniente da S-adenosil metionina) são maiores no citosol das células hepáticas⁵¹. A metilação é um processo bioquímico essencial para a manutenção da vida pois atua nos processos de regulação da expressão gênica, preserva a estrutura dos cromossomos e modula os eventos de recombinação dos genes⁵². A metilação acontece pela adição de um radical metil na posição 5' da citosina na molécula do DNA, e cujo resultado esperado é o silenciamento de genes pela inibição da ligação dos fatores de transcrição^{34,43,52}. Da mesma forma que o DNA, o As inorgânico é metilado nas formas MMA (ácido monometilarsênico) e DMA (ácido dimetilarsênico) em humanos e animais e possivelmente essas formas orgânicas metiladas são menos tóxicas e mais fáceis de serem excretadas pela urina^{34,40,43,51}. Nos fungos e bactérias essa reação química produz detoxificação⁵¹.

A interferência no processo de metilação natural do DNA pode ocorrer devido exposição prolongada a esse metal. O As é uma substância extremamente tóxica, conseguindo inativar cerca de 200 enzimas, especialmente aquelas envolvidas na produção de energia celular e na síntese e reparo do DNA⁴⁰ (Figura 3).

A maior parte do As e seus metabólitos é excretada pela urina (45 a 85%) e uma pequena fração pelas fezes. Também pode ser encontrado no suor e na pele, concentrando-se nas unhas (Figura 4) e cabelos por se ligarem a proteínas nos grupamentos sulfidríla^{49,50}. Na urina o metabólico mais abundante é o DMA (40 a 60%), seguido das formas inorgânicas penta e trivalentes (20 -25%), e o MMA (15 – 25%)^{34,40}.

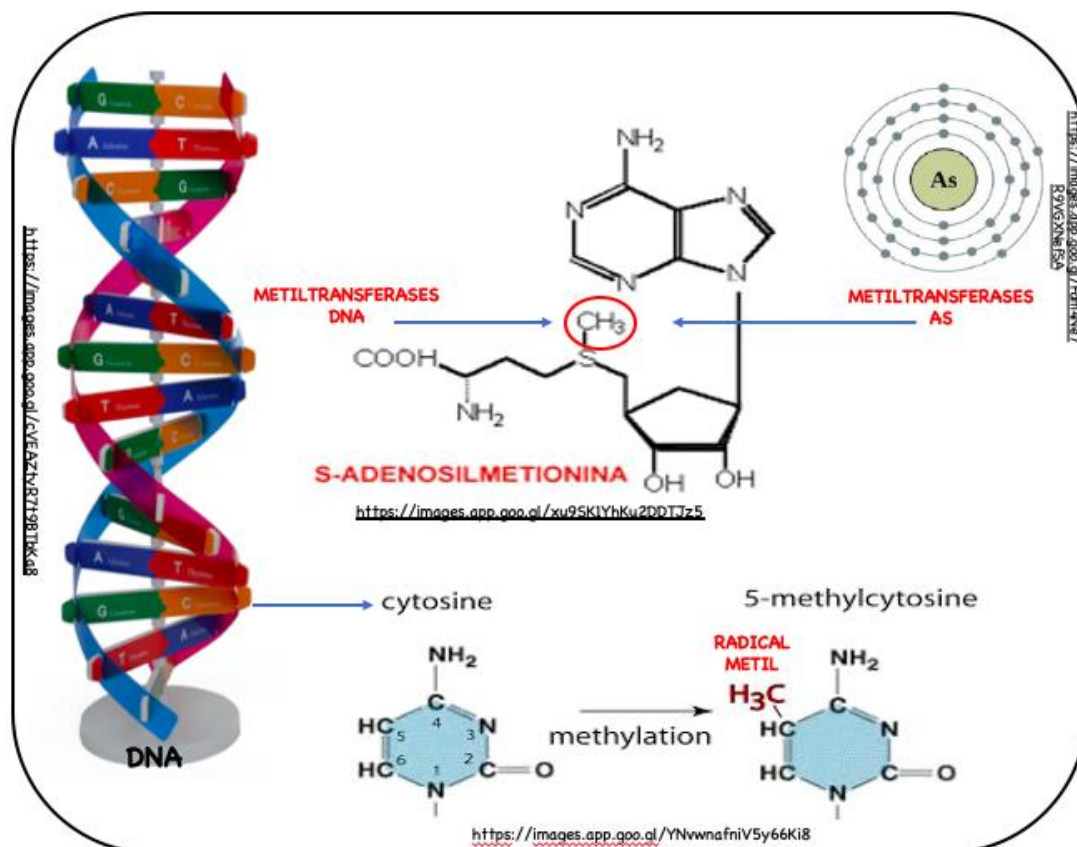


Figura 3. Metilação do DNA e arsênio: A biometilação química suprime a transcrição de determinados genes e promove alterações na estrutura da cromatina. Está relacionada a fatores biológicos individuais e ambientais, mas principalmente ao polimorfismo genético da enzima metiltransferase do As III (As 3MT). O arsênio e o DNA celular competem pelo mesmo radical metil proveniente da enzima S-adenosil-metionina (SAM), levando à insuficiência dessa coenzima. Desta forma, a hipometilação do arsênio levaria à ativação de genes aberrantes^{5,41,42}. Adaptado pela própria autora com ilustrações do google imagens.

Arsenobetaína e arsenocolina são compostos de arsênio orgânico presentes em peixes e frutos do mar. Ao serem ingeridos são prontamente absorvidos, não sofrem metabolização e 50% são excretados pela urina nas primeiras 6 horas³⁴.

A meia vida do As no corpo humano varia de um indivíduo para outro, pois depende da capacidade de metabolização de cada organismo. Dentro desse contexto, o período compreendido desde a absorção até a excreção pode ser

aproximadamente de 10 horas até 3 dias e, para os compostos de arsênio metilados, até 30 dias^{34,43}.



Figura 4. Unhas de “Mees- Aldrich” no arsenicismo.

Retirado de: <http://deolhonaanalise.blogspot.com/2011/11/identificacao-do-arsenio-em-materiais.html>.

1.2.2 TOXICIDADE DO ARSÊNIO

Indivíduos sujeitos à exposição crônica ao arsênio (média de 10 a 20 anos) podem desenvolver vários tipos de câncer: pele, pulmão, próstata, bexiga, rins e fígado. Também doenças cutâneas, gastro-intestinais, cardiovasculares, hematológicas, pulmonares, neurológicas, endocrinológicas e reprodutivas podem ocorrer^{40,42}. Os efeitos tóxicos agudos têm como sintomas e sinais mais frequentes: fraqueza, perda do apetite, emagrecimento, anemia, cólica abdominal, náuseas, diarreia prolongada, alterações na pele e unhas (Figuras 4 e 5). Em casos mais graves, o paciente pode apresentar hemorragia, edema cerebral, choque e evoluir para óbito^{40,43}. Os primeiros sinais da exposição a longo prazo geralmente são observados na pele (mudança da pigmentação, lesões e hiperqueratose), nervos periféricos (polineurite), fígado (cirrose, hipertensão portal, degeneração gordurosa e neoplasia) e também trombocitopenia^{40,42}.



Figura 5. Lesões cutâneas mais frequentes no arsenicismo: ceratoses palmoplantares

Retirado de: <https://arseniodc1516.wixsite.com/arsenio>.

Bioquimicamente os mecanismos envolvidos na toxicidade e carcinogenicidade provocados pelo arsênio ainda não estão completamente esclarecidos. Estudos sugerem que o *stress* oxidativo é o principal mecanismo envolvido na carcinogênese induzida pelo arsênio, principalmente por inibir etapas da respiração celular dentro da mitocôndria^{34,40,43,51}. Nas intoxicações, esta organela apresenta um acúmulo excessivo de As, que culmina por comprometer etapas do metabolismo proteico responsáveis pela geração de energia na célula, como também pode modular negativamente os mecanismos epigenéticos, causando danos ao organismo^{40,43}.

A formação de radicais livres é um processo natural da fisiologia celular e ocorre principalmente nas mitocôndrias, em diversos sistemas biológicos. Porém, quando em excesso, pode levar a danos oxidativos^{53,54}. Alterações no status redox celular geradas pela intoxicação com arsênio inorgânico podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), tais como superóxidos e radicais hidroxila. Esses são capazes de lesionar proteínas, induzir aumento da peroxidação lipídica, gerar grupos sulfidrilas não proteicos e causar danos ao DNA^{40,49,50}.

Para diminuir ou anular esses efeitos deletérios, entram em ação enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase^{34,53,55}. O desequilíbrio redox desencadeado pelo estresse oxidativo, estimula a transcrição de genes inflamatórios e de fatores de transcrição cujos genes codificam várias citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. A ativação do fator nuclear Kappa B (NFkB), desencadeia a produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 12⁵⁵. A própria resposta inflamatória induz a formação de radicais livres e, desta forma, na permanência do estímulo agressor, instala-se um ciclo vicioso que contribui para a progressão de diversas doenças⁵⁵.

Também são relatados aumento dos fatores de crescimento e desequilíbrio na relação apoptose/regeneração celular como uma das causas de proliferação celular e formação de tumores^{40,42}. Disfunções imunológicas também são encontradas, principalmente nas intoxicações crônicas. Pesquisas em animais sugerem que o As pode suprimir a produção de IgM e IgG, inibir a produção antigênica, diminuir a atividade e proliferação de macrófagos, reduzir o número de linfócitos TCD4+ e abolir as respostas de hipersensibilidade tardia, contribuindo para maior susceptibilidade a infecções virais e bacterianas. A supressão das respostas imunes envolvendo células TCD8+, levariam também ao crescimento de tumores⁴².

Esquemas ilustrativos dos efeitos oxidativos e epigenéticos do arsênio são mostrados nas Figuras 6 e 7.

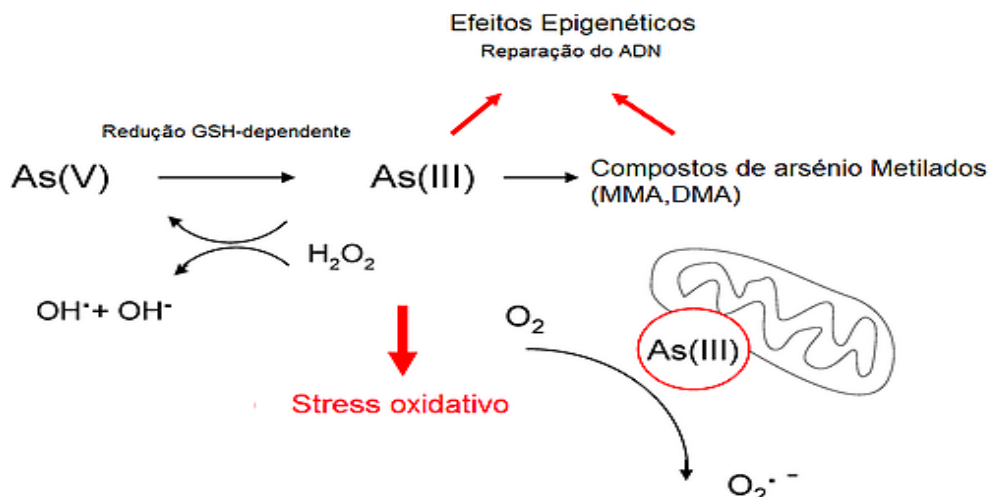


Figura 6. Mecanismo proposto para carcinogênese por arsênio: O *stress oxidativo* é o principal mecanismo na carcinogênese induzida pelo arsênio. No nível celular a mitocôndria é a organela mais atingida, levando a inativação de enzimas e perda do potencial de membrana^{5,41}.

Retirado de: <https://arseniodc1516.wixsite.com/arsenio>

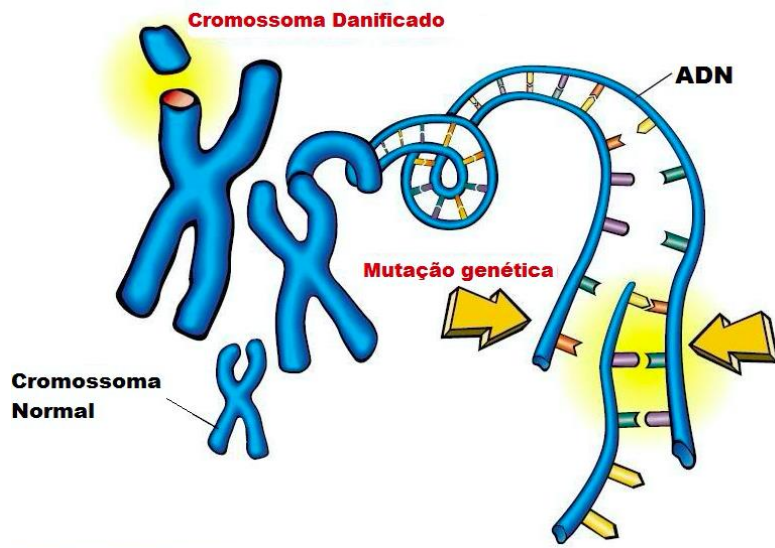


Figura 7. Prováveis efeitos genéticos induzidos pelo arsênio: estudos de genotoxicidade em modelos animais evidenciam que o arsênio pode interromper a expressão de diversos genes (particularmente os envolvidos nas vias de transdução de sinal), prejudicar o processo de divisão celular, inibir os mecanismos de reparo do DNA e provocar mutações genéticas. Os radicais livres estão envolvidos nesse processo^{5,40,41,42,45}.

Retirado de: <https://arseniodc1516.wixsite.com/arsenio>

O tratamento nos casos de contaminação aguda com arsênio em doses elevadas é sintomático e tem por objetivo estabilizar os sinais vitais do paciente e inativar e eliminar o As da circulação⁵⁶. A quelatoterapia é utilizada há várias décadas e é considerada um método coadjuvante eficaz nos envenenamentos por metais tóxicos, incluindo o As⁵⁶. Quelantes são substâncias capazes de doar um par de elétrons e se ligar covalentemente a um íon metálico, formando um complexo quimicamente inerte, não tóxico, permitindo rápida excreção renal¹⁰. Porém não são isentas de efeitos colaterais, porque podem remover metais essenciais ou remanejar os metais tóxicos para outros tecidos, portanto é necessária uma escolha criteriosa do agente quelante¹⁰. Dentre os habitualmente usados na arsenicose aguda estão os quelantes de tiol como: 2,3-dimercaptopropanol, ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico e seus derivados 2,3-dimercapto-1-propanossulfonato de sódio (DMPS, unitiol), e 3-Mercapto-D-valina (Penicilamina, PCA)^{10,50,57}. A literatura também cita o uso de substâncias antioxidantes, vitaminas e alguns fitoterápicos que atuam minimizando os danos bioquímicos causados ao organismo pelo As^{10,56}.

Atualmente não há nenhum regime de tratamento baseado em evidência para tratar envenenamento crônico por arsênio⁵⁸. Por diferentes estudos, tem-se demonstrado, em humanos, animais e plantas, efeitos do medicamento homeopático *Arsenicum album* sobre a eliminação de arsênio previamente fixado no organismo, ou diminuindo os efeitos colaterais da arsenicose^{58,59,60}.

Belon et al., 2006, realizaram um estudo duplo cego controlado com placebo em aldeias da Bengala Ocidental, cuja população está exposta a níveis altos de arsênio devido ao consumo de águas subterrâneas contaminadas. A incidência de doenças auto-imunes nesses habitantes é alta, com valores de anticorpos ANA (Anti-nuclear antibody) elevados no sangue, mesmo nos assintomáticos. Outros sinais e sintomas como fadiga extrema, dores articulares, distúrbios gástricos, urinários, esclerodermia e outras doenças de pele também foram observados nestas pessoas. Nesta pesquisa foi utilizado o medicamento homeopático *Arsenicum album* nas potências 30 cH (1 dose correspondente a 8 glóbulos, 2 vezes ao dia por 10 dias, seguida de pausa por 10 dias e reinício do ciclo) e 200 cH (1 x dia por 5 dias, seguida de pausa por 20 dias e recomeço do ciclo), sendo usado álcool a 30% como placebo, por um período de 2 meses. Outros parâmetros foram avaliados como contagem de glóbulos vermelhos,

glóbulos brancos e níveis de glicemia. Os resultados, após 2 meses do término das medicações, mostraram efeitos modulatórios nos grupos que receberam *Arsenicum album* nas potências 30 e 200 cH, com reversão dos níveis de anticorpos ANA para níveis normais nos pacientes que apresentavam altos títulos para esse marcador, como também melhora nos parâmetros hematológicos citados. Os autores aventam a hipótese de que drogas homeopáticas sejam capazes de desencadear a expressão de genes relevantes em mecanismo de cascata, normalizando as referidas funções⁶¹.

Coelho et al, 2018, avaliaram mudanças comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*) induzidas por arseniato de sódio (AS), analisando a locomoção e parâmetros relacionados à ansiedade. Os animais foram tratados com medicamento homeopático *Arsenicum album*. O delineamento experimental contemplou 4 grupos com 8 peixes cada. Um grupo controle positivo (intoxicados com AS), um grupo “branco” (não desafiado) e dois grupos intoxicados e tratados com *Arsenicum album* nas potências 6 cH e 30 cH, respectivamente. Os animais foram expostos ao AS por 96 horas e os grupos tratados receberam a medicação 1 dia antes da exposição, totalizando 5 dias de experimento. Foi observado efeito ansiogênico no grupo controle positivo. Os parâmetros analisados foram: movimentos erráticos, tempo de permanência no lado claro e escuro e número de quadrantes no campo aberto. Em todos os parâmetros observou-se que os grupos tratados foram semelhantes aos grupos não intoxicados (controle), o que demonstra capacidade *ansiolítica-like* dos tratamentos. Os efeitos mais significativos foram obtidos com *Arsenicum album* 6 cH, evidenciando seu potencial terapêutico⁶².

1.3 HOMEOPATIA: FUNDAMENTOS E ASPECTOS ATUAIS

1.3.1 CONCEITOS GERAIS DE HOMEOPATIA

Insatisfeito com a medicina do século XVIII, bastante iatrogênica, o médico alemão CHRISTIAN FREDERICH SAMUEL HAHNEMANN (1755-1843), aos 34 anos decide abandonar sua carreira e dedicar-se a traduzir livros de grandes autores da Medicina, visto que falava fluentemente diversos idiomas⁶³. Durante a tradução da Matéria Médica de Cullen, Hahnemann discorda sobre a

ação terapêutica da quina (*Chinchona officinalis*) e decide experimentar em si mesmo⁶⁴. Observou o surgimento de sintomas semelhantes à malária que desapareceram após a suspensão da droga e deduziu que a quina curava as pessoas com malária porque, quando administradas a pessoas saudáveis, produzem sintomas semelhantes a esta doença⁶³, baseando-se em um dos fundamentos propostos por Paracelso, no século XVI. Proclama, assim, a famosa Lei dos Semelhantes (*Similia similibus curentur*) e decide fazer experimentações em pessoas saudáveis com diversas substâncias (Belladona, digital, mercúrio e outros) a fim de comprovar e sistematizar essa lei de cura⁶⁴. A partir desses fatos, tem origem o sistema médico ao qual Hahnemann denominou Homeopatia. Uma prática médica além do seu tempo, pioneira em utilizar uma terapêutica baseada num método experimental⁶³. A palavra homeopatia deriva de *homoios*, que significa “semelhante” e *pathos*, “doente”, ambas com origem greco-latina. É uma ciência que considera o indivíduo como um todo e não em partes isoladas^{65,66}.

A experimentação no homem são tornou viável a descoberta de possíveis efeitos curativos de várias substâncias sem os vieses advindos de pessoas doentes, o que geraria dúvidas sobre a origem dos sintomas (decorrentes da ação da droga ou da doença em si). Hahnemann denominou de *patogenesia* ao conjunto de sintomas desencadeados pela substância experimentada pelo indivíduo sadio e organizou estes dados de forma a compor uma *Matéria Médica*. Atualmente, experimentações originais seguem um maior rigor epidemiológico, limitando o estudo de novos medicamentos por esse método⁶³.

Individualidade e totalidade são conceitos que integram os fundamentos da homeopatia. Seguindo a lei dos semelhantes, um medicamento capaz de desencadear no ser humano saudável um conjunto de sintomas que coincidem com os referidos pelo indivíduo doente é capaz de tratar a enfermidade e também restaurar de forma duradoura a *energia vital* do paciente. Esse é o princípio do medicamento único, incorporado à filosofia Homeopática, que considera o ser vivo como uma unidade indivisível^{63,64}. Em 1796, Hahnemann publicou seu primeiro trabalho no *Jornal de Medicina Prática*, fruto da experimentação de várias substâncias. Adotou as doses infinitesimais (ultra-

diluídas) visando diminuir os efeitos tóxicos das drogas no tratamento de seus pacientes^{65,67} e acrescentou na sua prática a succussão dos medicamentos⁶⁴.

Dinamização ou potencialização é o resultado de diluições e succussões (agitações verticais) sucessivas em substâncias solúveis (geralmente água purificada e etanol), ou por trituração em lactose, quando de substâncias insolúveis^{67,68}. Hahnemann acreditava que era desta forma que se desenvolvia a força do medicamento⁶⁷. Durante esse processo, o medicamento homeopático diminui a concentração química do soluto de origem, ou até mesmo, pode não apresentar nenhuma molécula do composto de partida⁶⁷. Este fato gera controvérsias no meio acadêmico sobre a real eficácia desses tratamentos. Como agravante, o mecanismo de ação do medicamento homeopático não é conhecido e os princípios de doses infinitesimais e de similitude não são compatíveis com os conceitos da farmacologia clássica, baseados no modelo chave-fechadura e no racional dose-efeito^{69,70,71}. Contudo, há que se considerar que apenas a diluição não confere qualquer poder medicamentoso à diluição resultante, pois é a partir da succussão (agitação vertical ritmada) que se constata os efeitos biológicos das preparações homeopáticas, a despeito da ausência do soluto original^{68,69,70,72,73}.

Atualmente a homeopatia é uma ciência utilizada mundialmente, por ser considerada segura, eficaz e passível de ser aplicada em diversas áreas do conhecimento. Dentro do processo de cura homeopático, na hierarquia dos sintomas, as manifestações psíquicas e emocionais são mais valorizadas, por estarem envolvidas na gênese do processo de adoecimento e, conseqüentemente, na etiopatogenia das moléstias orgânicas. Desta forma, o tratamento homeopático procura atuar de forma individualizada e integrada, com o objetivo de proporcionar um bem-estar físico, mental e social⁷⁴.

Os medicamentos homeopáticos podem ter sua origem nos reinos animal, vegetal e mineral, bem como de outros fármacos, seguindo as normas estabelecidas pela Farmacopéia Homeopática Brasileira^{67,72}. O medicamento é diluído seguindo uma progressão geométrica⁶⁸, de forma que ocorre uma diminuição da concentração do insumo ativo pela adição do insumo inerte, mas sempre intercalado pelas succussões⁶⁶. As escalas de diluição podem ser decimal: DH (1:9); centesimal: cH (1:99); milesimal: M (1:999) e 50 milesimal:

LM (1:49.999) e seguir os métodos Hahnemanniano, Korsakoviano ou Fluxo Contínuo^{67,72} (Figura 8).



Figura 8. Escala centesimal de Hahnemann

Retirado de: <http://prdma.comunidades.net/homepatia-pagina-3>.

Na prática clínica consideram-se potências (ou dinamizações) baixas as inferiores a 12 cH; médias entre 12 e 30 cH e altas acima de 30 cH⁶⁸. Os critérios para o uso de diferentes potências variam entre os autores. As escolas homeopáticas da Alemanha e da França adotam o princípio de que diferentes dinamizações atuam em esferas distintas no organismo⁷⁵. Medicamentos com baixa potência são indicados para uma abordagem orgânica (sintomas mais físicos, com efeitos sobre estruturas), média para sintomas físicos e mentais associados (efeitos sobre a regulação bioquímica e funcional dos órgãos) e alta para casos em que predominam os sintomas mentais e comportamentais⁷⁵. Para o homeopata francês Benoit Jules Mure (1809-1857), “as baixas diluições convêm às doenças agudas e as diluições elevadas convêm às doenças crônicas ou miasmáticas”⁷⁶. Possivelmente, esse manejo clínico tem contribuído para uma prescrição mais segura, ágil, duradoura e com menos efeitos secundários. A maioria dos protocolos de pesquisa em homeopatia utilizam os medicamentos nas potências 6, 12, 30 e 200 cH, tais como habitualmente se prescreve na prática clínica^{77,78}.

A dose, ou número de gotas, permanece um tema controverso entre os homeopatas, pois ainda não se sabe o quanto tais variações interferem ou não no desfecho clínico⁷⁹. Em um estudo experimental realizado em 2006, ratos Wistar foram intoxicados com arseniato de sódio (16,8 mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal e tratados com doses diferentes de *Arsenicum album* 6 cH (60 a 295 µL) por via oral, 2 vezes ao dia, 3 dias consecutivos, para avaliação da mobilização de arsênio dos tecidos e excreção do metal na urina. O controle foi feito com a administração de veículo (solução hidro-alcoólica 30%). As análises foram feitas em duas etapas, com intervalo de sete dias. A quantidade de arsênio liberada na urina foi 0,293; 0,368; 0,347 ppm, respectivamente, portanto, houve diferença significativa para doses equivalentes a 147 e 295 µL, quando comparadas com a dose de 60 µL. O grupo controle não mostrou eliminação de arsênio na urina⁷⁹.

É sabido que a partir da 12^a diluição centesimal não se encontram mais moléculas do soluto original. Este cálculo está baseado na Lei de “Avogadro-Ampère”, cuja constante (ou *número de Avogadro*) equivale a 6.023×10^{23} e representa o número de moléculas contidas numa molécula-grama da substância. Esse número indica que uma diluição superior a 10^{-23} M não contém qualquer molécula da substância diluída^{68,71}. Tal é o cerne da polêmica porque, na medida em que as concentrações do fármaco diminuem com as diluições sucessivas, sua atividade farmacológica tende à zero. De fato, é o que ocorre. Contudo, outro fenômeno surge com as dinamizações, em função da miríade de alterações físico-químicas que ocorrem no solvente durante a execução de diluições e agitações em série^{69,71}.

Segundo Holandino, pesquisadores em todo o mundo buscam comprovar o princípio da similitude, através de diferentes modelos empíricos. Diversas abordagens teóricas e experimentais corroboram na busca do entendimento do fenômeno da transmissão da informação em nível celular, físico e químico, a partir de soluções ultradiluídas. Metodologias baseadas em medidas de condutividade elétrica, calorimetria, espectrometria UV e Raman, termoluminescência, ressonância nuclear magnética, microscopia eletrônica de varredura, dentre outras, possibilitaram evidenciar variações nesses parâmetros em função do grau de dinamização de uma dada substância, as quais supostamente estariam envolvidas nos efeitos biológicos observados⁷⁴.

A homeopatia é reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina desde 1980. Em 2006, passou a fazer parte das Práticas Integrativas e Complementares, aprovada pelo Ministério da Saúde, na qual promoveu a implementação não só da Homeopatia como outras práticas alternativas e complementares no SUS⁷³. Na Medicina Veterinária, a homeopatia atua de forma ampla e, dentre as indicações mais frequentes, citam-se o controle de endo e ecto-parasitas, o tratamento de mastites e outras doenças infecciosas e o uso na criação de diversos animais de produção como ferramenta zootécnica⁸⁰. Em 1999, a homeopatia no meio rural passou a ser recomendada no Brasil, pela Instrução Normativa número 7, que trata sobre a produção de produtos orgânicos⁸¹. O uso de preparados homeopáticos no solo e na água mostra seu potencial de sustentabilidade, por facilitar processos adaptativos dos seres vivos de um determinado ecossistema, ao promover o reaparecimento de animais, insetos predadores e plantas em ambientes comprometidos pela ação antrópica, além do risco zero de contaminação ambiental. Ao contribuir para o desenvolvimento rural sustentável, a homeopatia se fundamenta também como uma ciência aplicável ao meio-ambiente, além de contribuir para a melhoria das condições sócio-econômicas de diversas famílias⁸².

Atualmente, o uso da homeopatia vem se destacando na aquicultura marinha, com resultados zootécnicos bastante promissores. Estimuladas pela identificação crescente de efeitos colaterais provocados por drogas utilizadas no cultivo de moluscos marinhos, peixes e crustáceos nos últimos anos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com homeopatia nesses casos. Benefícios relacionados a incremento na taxa de crescimento, aumento da sobrevivência e maior proporção de lipídios no músculo, aumento na contagem de hemócitos, maior atividade das enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) e ampliação das reservas energéticas em alguns tecidos, têm sido citados na literatura^{83,84}. Recentemente, estudos epigenéticos com bivalvos marinhos (vieiras) foram realizados buscando compreender o mecanismo de ação dos insumos homeopáticos utilizados para esse fim^{84,85}.

1.3.2 SOBRE A ISOTERAPIA

A isoterapia é baseada no princípio da igualdade, onde dinamizações da própria substância que provoca a doença são realizadas e os respectivos produtos são administrados ao doente, promovendo a cura ou melhora do quadro clínico⁶⁸. Historicamente, a isoterapia tem sido utilizada desde os tempos de Hahnemann como parte da homeopatia clássica para o tratamento de intoxicações^{68,81}. Louis LANDOUZY (1845-1917) definiu a isoterapia como “método terapêutico que, considerando as igualdades de potência, de ação e de força, procura induzir os elementos, os homens, os animais e os vegetais - em uma palavra, as causas que produziram a doença - a promoverem a cura”⁶⁸. Johann Wilhelm Lux, veterinário, Doutor em medicina e filosofia, foi o pioneiro na utilização de ultradiluições nas intoxicações e em processos de iatrogenia. Realizou seu primeiro tratamento isopático em 1831, durante uma epidemia em gado na Hungria⁶⁸.

Isoterápicos são produtos cuja matéria prima pode ser de origem orgânica ou inorgânica, submetidas ao processo de dinamização e utilizadas para promover a redução de danos ao organismo⁸⁶. Ou seja, medicamentos isoterápicos são feitos a partir da própria substância que causou a doença. Pelagem de animais, como de cão e de gato, por exemplo, podem ser utilizados no preparo de medicamentos isoterápicos e usados para tratamento de alergia ao pelo desses animais⁸⁷. Constantin Hering, médico homeopata, designou como “nosódios” os medicamentos cujos insumos ativos fossem de origem patológica, tanto animais quanto vegetais. A Farmacopéia Francesa incorporou os termos “isoterápicos” e “nosódios”, conceituando-os como “bioterápicos”⁸⁶.

O uso de isoterápicos vem se consolidando em outras áreas de atuação, além da prática médica. Seus efeitos sobre os sistemas biológicos também são visíveis nos animais, plantas e solo. Santos et al, 2015⁸⁸ utilizaram a isoterapia como ferramenta de controle alternativo do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e concluiu que o tratamento reduziu a infestação nestes animais.

Andrade e colaboradores avaliaram a resposta a dinamizações do isoterápico *Justicia* nas potências 3 cH, 6 cH, 12 cH, 18 cH, 24 cH e 30 cH, no crescimento e na produção de cumarina em *Justicia pectoralis*. Os tratamentos foram em cego e tiveram início após o plantio das mudas, por pulverização da parte aérea, em intervalos semanais. As plantas foram colhidas quatro meses

após o plantio e analisadas. A dosagem da cumarina (1-2 benzopirona) nas amostras foi feita em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). As variáveis de crescimento, matéria fresca de folhas e caules e matéria fresca total oscilaram em função das dinamizações de *Justicia* e com significância estatística. As plantas com maior crescimento produziram menor conteúdo de cumarina. Destacam-se as plantas que foram tratadas com o isoterápico na 30 cH que, além de crescerem retomaram a produção de cumarina, demonstrando maior sensibilidade da planta a esta dinamização. Os autores concluem que *J. pectoralis* respondeu às preparações do isoterápico de *Justicia* variando significativamente o metabólito de defesa (cumarina), demonstrando o efeito potencial de preparados homeopáticos nas plantas⁸⁹.

Souto 2007, avaliou o tratamento de infecção urinária em ratas Wistar, comparando a ação de medicamentos homeopáticos e bioterápicos destituídos de patogênese, frente a um antibiótico sensível, macrodantina, administrados por via oral. Uma cepa de *Escherichia coli* proveniente de paciente hospitalizado com infecção urinária foi utilizada no preparo da cultura, que serviu para induzir a infecção bacteriana nas ratas e para preparar os medicamentos bioterápicos. O tratamento do grupo que recebeu antibiótico (macrodantina) durou 5 dias. Os demais foram tratados 2 vezes ao dia, por um período de 30 dias. *Escherichia coli* 30 DH (nosódio vivo) foi preparado a partir da cepa multiresistente de *Escherichia coli*. *Cantharis vesicatoria* 6 cH, 12 cH e 30 cH foram preparados conforme a Farmacopéia Homeopática Brasileira. Urina 30 cH (bioterápico) foi formulado a partir de um pool de urina de três ratas infectadas. Foram formados 6 grupos de 10 animais cada e o grupo controle recebeu tratamento com antibiótico. Os resultados mostraram que os medicamentos homeopáticos e bioterápicos foram efetivos no tratamento da infecção induzida em ratas por *Escherichia coli* ao serem comparados com a ação terapêutica do antibiótico, se revelando como uma opção terapêutica segura, principalmente nos casos de resistência bacteriana. Todavia demanda um tempo maior de tratamento⁹⁰.

1.3.3 ASPECTOS ATUAIS DA PESQUISA BÁSICA EM HOMEOPATIA: HIPÓTESES SOBRE A TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos de ação envolvidos na atuação do medicamento homeopático nos últimos 10 anos tem-se observado enorme avanço na pesquisa básica em homeopatia, principalmente no Brasil, Itália e Índia. Estudos recentes apontam para determinadas particularidades específicas do tratamento homeopático envolvendo fenômenos relacionados à não linearidade, à coordenação de efeitos sistêmicos e, possivelmente, à regulação epigenética⁷⁰.

Mais recentemente, há uma predisposição em se eleger estudos *in vitro* ou que utilizam métodos alternativos ao uso de animais vertebrados em pesquisa. Curiosamente, o desenvolvimento de novos métodos de pesquisa permitiu observar que o fenômeno homeopático tem características de translacionalidade, ou seja, os resultados obtidos em laboratório geram informações cuja aplicação na clínica pode ser imediata⁷⁰. Santana et al. (2017)⁹¹ demonstraram que, ao infectar macrófagos em cultura com *Leishmania amazonensis* e tratá-los com *Antimonium crudum* 30 cH, ocorria diminuição significativa da atividade lisossomal e bloqueio na produção de MCP-1, uma quimiocina essencial para o recrutamento de monócitos no sítio inflamatório. Tal efeito explicou achados anteriores obtidos *in vivo* com o mesmo medicamento e mostra que esse tratamento pode limitar o ciclo do parasita no próprio hospedeiro. Esse resultado indica também a possibilidade de se obter efeitos sinérgicos com quimioterápicos anti-parasitários utilizados no tratamento convencional da leishmaniose, reduzindo seus efeitos tóxicos, seu custo e a probabilidade de desenvolvimento de resistência pelo parasita às drogas anti-parasitárias. Este exemplo ilustra a relação direta entre a pesquisa básica homeopática e possíveis aplicações práticas do conhecimento aprendido⁷⁰.

Em se tratando de substâncias ultradiluídas, várias teorias têm sido propostas para explicar como a informação do medicamento seria impressa no solvente e como seria transmitida, conservando-se na solução resultante alguma forma de memória original da substância primitiva, no decurso das sucessivas diluições, independentes da presença ou não de moléculas⁶⁸. Nos últimos anos, os estudos das propriedades físico-químicas do solvente usado no preparo desses medicamentos têm constatado a presença de nanopartículas. Em outros experimentos, reconhecem-se a existência de nanobolhas, que poderiam atuar como “transportadores” intracelulares⁷⁰. Pesquisas mais recentes, como as

desenvolvidas por Steven Cartwright, demonstraram mudanças na atividade dipolo da água utilizada como veículo nas soluções dinamizadas, pressupondo existir ressonância elétrica entre o medicamento e a água^{70,92}.

1.3.3.1 BIOSEMIÓTICA

A Teoria dos significados corporais (TSC), desenvolvida por Bastide e Lagache nos anos 90 mostrou uma forma de observar o fenômeno homeopático sob a visão da biosemiótica, que vai além da perspectiva da farmacologia clássica. Segundo a TSC, toda inter-relação entre sistemas vivos (incluindo plantas e micro-organismos) depende da troca de informações, as quais operam por meio de 3 elementos essenciais: uma matriz geradora da informação (substância de partida das diluições), um carreador da informação (água) e um receptor da informação (paciente)^{93,94}. A aplicação de conceitos e métodos importados da semiótica aos resultados experimentais obtidos, conforme trabalho desenvolvido por Lagache, possibilitou a construção de uma base racional para compreensão do fenômeno homeopático diferente do paradigma chave-fechadura da farmacologia clássica, o que permitiu dar mais clareza ao fato de que homeopatia e farmacologia são fenômenos distintos e não comparáveis entre si^{93,94}.

1.3.3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ÁGUA

Afirmar que altas diluições homeopáticas só contenham água pura não é aceitável, pois “água pura” simplesmente não existe no planeta Terra. Mesmo a água que passou por processos de destilação, ultrafiltração ou autoclavagem contém gases dissolvidos e contaminantes em escala nanométrica, originados da atmosfera e das paredes dos recipientes onde é contida⁹⁵. Desta forma, a água pode dar origem a estruturas com diferentes graus de complexidade, envolvendo processos físico-químicos associados ao soluto dissolvido em seu meio⁹⁶. O que as pesquisas buscam confirmar é se essas nanoestruturas presentes nas preparações homeopáticas têm potencial para exercer efeito biológico específico baseado no princípio de similitude, ou se são apenas nano-contaminantes aleatórios⁹⁵.

A água é a substância mais abundante do nosso planeta e de vital importância para a manutenção da vida. Interações entre a água e moléculas biológicas acontecem de forma dinâmica nos mais diversos sistemas, inclusive no organismo humano, onde o percentual de água é de 70% em volume (ou 99% em número de moléculas). Apesar de ter uma estrutura simples, esta molécula apresenta especificidade e comportamento físico-químico próprios⁹⁷. É dotada de uma polaridade molecular por apresentar extremidades negativas (no átomo de oxigênio) e positivas (átomo de hidrogênio)⁹⁶.

A molécula da água apresenta uma estrutura simples, sendo composta por 2 átomos de hidrogênio, cada um compartilhando um par de elétrons com 1 átomo de oxigênio, através de ligações covalentes. Outro tipo de interação entre as moléculas polares são as ligações de hidrogênio. Nessas, o átomo de hidrogênio de uma molécula de água se liga ao átomo de oxigênio de outra molécula de água. Apesar de ser uma ligação de curto alcance, apresenta uma força intermolecular intensa por se ligar a um elemento muito eletronegativo, o oxigênio. Ligações similares também podem ocorrer com o nitrogênio ou o flúor^{97,98}.

O oxigênio possui um par de elétrons não compartilhados, levando ao surgimento de 2 dipolos elétricos na molécula da água, um para cada ligação O-H⁹⁹. Desta forma, a molécula de água passa a ter uma atuação dipolar, com tendência a formar ligações de hidrogênio intermoleculares, com diferentes formatos que, ao se enovelarem, formam agregados cada vez maiores. Como consequência dessas interações em cascata, as moléculas de água podem apresentar mudanças no seu comportamento, exibindo fenômenos de cooperatividade e coerência^{98,100} (Figura 9).

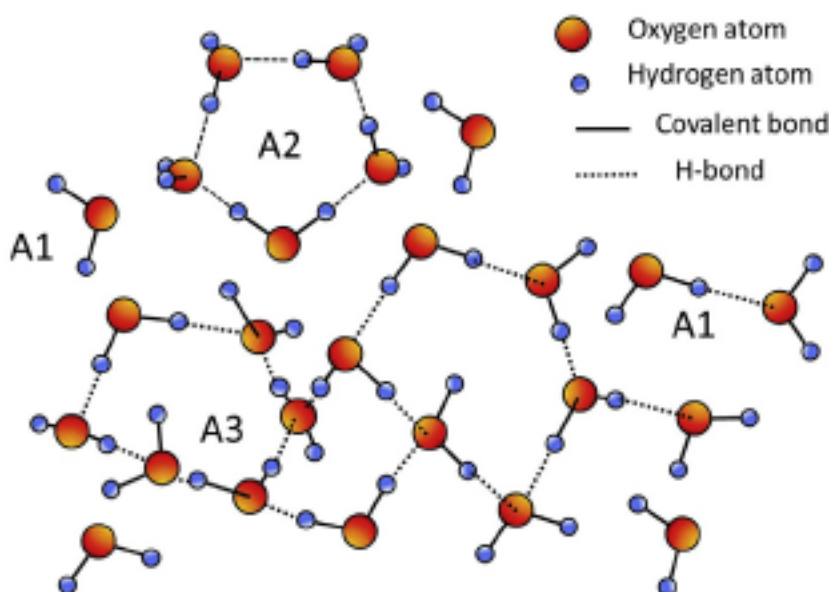


Figura 9. Modelo de estrutura da rede de ligação de hidrogênio nas moléculas de água: A1: molécula livre. A2 e A3: moléculas parcialmente ligadas, formando grupamentos regulares de água (A2 - pentagonal), e irregular (A3). A teoria postula a possível formação de aglomerados feitos de centenas de moléculas em formas geométricas¹⁰⁰.

Retirado de: Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A. Homeopathy. 2014;103(1):4-21. doi:10.1016/j.homp.2013.08.003.

1.3.3.3 HIPÓTESE: *CLUSTERS* DE ÁGUA

O modelo que melhor representa a água como um conjunto de moléculas é o modelo de misturas, conhecido por *clusters*, fundamentado por Frank e Wen em 1957⁹⁴. Monômeros de H₂O ou clusters (H₂O)_n conectados por ligações de hidrogênio compõem a água líquida. Essas unidades interligadas podem formar agregados fechados, contendo ou não moléculas em seu interior e assumirem formas pentagonais e/ou hexagonais^{98,101} (Figura 9).

Diversos autores estudaram a propriedade da água como meio de transferência de informações por meio de *clusters* ou clatratos^{102,103}. A hipótese dos clusters considera que moléculas do composto original livres na água ou em solução hidroalcoólica seriam circundadas e solvatadas pelas próprias moléculas de água, aprisionando partículas do soluto dentro desta cavidade.

Esses *clusters* seriam capazes de repetir padrões ao longo de diluições sucessivas, equivalentes às estruturas iniciais, mesmo que a substância original não esteja mais presente dentro da concavidade e dessa forma se transformar numa matriz de referência para a formação de outros clusters^{101,104}. As ligações de hidrogênio que formam os clusters tem duração de nanosegundos, porém os aglomerados de água (vários clusters) se comportam de forma diferente. A estabilidade dinâmica dessas estruturas moleculares, possivelmente são sustentadas por um padrão eletromagnético que envolve o conjunto (volume) e não apenas um determinado cluster. De acordo com Chaplin, o comportamento de uma grande população de moléculas de água pode ser estável, mesmo que as moléculas individuais sejam constantemente modificadas⁹⁶.

A busca da compreensão sobre os efeitos da homeopatia começou nos anos 80 e em 1988, após um estudo conduzido por Jacques Benveniste em se um modelo experimental clássico de degranulação de basófilos foi utilizado (anti-IgE era usada em substituição ao antígeno para deflagrar a liberação de grânulos de histamina por basófilos previamente sensibilizados com IgE), foi observado que as preparações homeopáticas testadas, à medida que ficavam mais diluídas, exibiam um padrão oscilatório diferente, ou seja, para algumas diluições observava-se um aumento na degranulação dos basófilos, e para outras, diminuição^{93,105}. Esse resultado gerou a hipótese de que a água poderia armazenar informações sobre as substâncias com as quais entrou previamente em contato e, posteriormente, transmiti-las a biosistemas. Benveniste chamou tal hipótese de “Memória da água”^{93,106,106,107}. Mas tais resultados não conseguiram ser reproduzidos em outros laboratórios, causando grande controvérsia no meio científico. Nos anos posteriores, alguns pesquisadores aprimoraram este modelo utilizando preparações homeopáticas da própria histamina (*Histaminum*) e citometria de fluxo para averiguação dos resultados, ao invés da análise visual das células. Ao contrário do experimento anterior, este pôde ser reproduzido em diferentes laboratórios, inclusive em um estudo multicêntrico envolvendo quatro universidades europeias⁹³.

Tal mudança de protocolo foi a chave para se compreender a questão da reprodutibilidade nesse caso. Os efeitos do *Histaminum* eram modulatórios e a degranulação dos basófilos só ocorria quando da presença de moléculas de anti-IgE, adicionadas à cultura em quantidade suficiente para que houvesse ligação

com seus receptores. O *Histaminum*, portanto, proveria um ajuste fino nas funções celulares e não a mera substituição da molécula deflagradora da degranulação⁶⁹.

Segundo Miranda 2006, alterações na distribuição do dipolo elétrico dos clusters das moléculas de água em altas diluições são influenciadas pelos processos de diluição e sucussão, pois poderiam intervir no tamanho e na forma dos *clusters*. Soluções diluídas com propriedades físico-químicas bem definidas (eletrostáticas, hidrofílicas e hidrofóbicas), contendo uma informação molecular muito específica, poderiam, portanto, alterar a estabilidade dos *clusters*. Considerando-se que tais *clusters* não duram mais que milionésimos de segundos, sendo extremamente instáveis em termos estruturais, o papel de padrões topográficos dinâmicos (não dependentes de uma estrutural estável) na transmissão da informação continua em investigação^{96,110}.

1.3.3.4 HIPÓTESE: MEMÓRIA ELETROMAGNÉTICA DA ÁGUA

Buscando compreender o mecanismo de ação dos efeitos primários das preparações homeopáticas ultradiluídas no que concerne ao fenômeno da transmissão da informação, alguns autores formularam hipóteses fundamentadas em modelos físico-químicos^{111,112}. Dentre vários, destacou-se em 1990, a pesquisa do Prof. Emiliano Del Giudice e colaboradores^{101,102} na construção de um modelo matemático que apontou a plausibilidade de haver modificações estáveis de natureza eletromagnética da água, baseado em pressupostos da eletrodinâmica quântica. Nessa perspectiva, a água formaria *clusters* com capacidade de repetir padrões ao longo de diluições sucessivas em função da coerência entre as respectivas funções de onda, “como se todas as moléculas dançassem a mesma música”. Cada domínio de coerência corresponderia a um campo eletromagnético específico, atuando nas propriedades físico-químicas da solução envolvida, tais como pH, densidade, capacidade calorífica, viscosidade, acidez, constante dielétrica, etc^{101,111}.

Em suma, a hipótese dos domínios de coerência propõe que o “imprinting” eletromagnético sobre moléculas de água determinado pelo soluto implicaria na reorganização dinâmica de sua estrutura, assumindo novas configurações as quais passariam a oscilar coerentemente, mantendo-se em equilíbrio, ainda que

as ligações intermoleculares, como as ligações de hidrogênio, sejam extremamente fugazes^{99,104,113}.

Dessa forma, a matéria se organizaria em domínios de coerência e as interações entre as estruturas seriam cooperativas de tal forma que as vibrações, ao se propagarem, assumiriam significados biológicos distintos⁹⁴. Variáveis como temperatura da água (abaixo de 100 graus), densidade da matéria e comprimento de onda do campo, influenciam a oscilação dos átomos no campo eletromagnético, de forma que quando dois elementos entram em sincronia, é gerada uma energia atrativa para todo o sistema¹⁰¹.

Elia e colaboradores¹¹⁴ investigaram se a água preparada pelas técnicas homeopáticas era diferente da água inicial, por meio de técnicas de calorimetria de fluxo, condutometria, pHmetria e outras. Em um dos experimentos, observaram aumento da condutividade elétrica após procedimento de preparação e envelhecimento da solução. Para explicar a natureza do mecanismo capaz de aumentar simultaneamente a condutividade elétrica e o calor da mistura após diluições e succussões repetidas, Elia se baseou no "mecanismo de salto" ou "jumping protônico", proposto por C.J.T. Grotthuss (1806)⁵⁸. Nesta hipótese, prótons (H^+) podem saltar de um átomo de oxigênio para outro em uma série de moléculas de água ligadas em cadeia pelas ligações de hidrogênio, com uma mobilidade muito maior em comparação com outros íons de raio equivalente. Quanto maior o número de *clusters* e ou seu comprimento, maior o valor da condutividade. Dessa forma, esses prótons percorreriam distâncias maiores no interior ou em torno das macromoléculas (Figura 10)^{114,115}.

Tomando-se ambas as abordagens, a formação de domínios de coerência implicaria também na facilitação do fluxo de prótons no meio líquido.

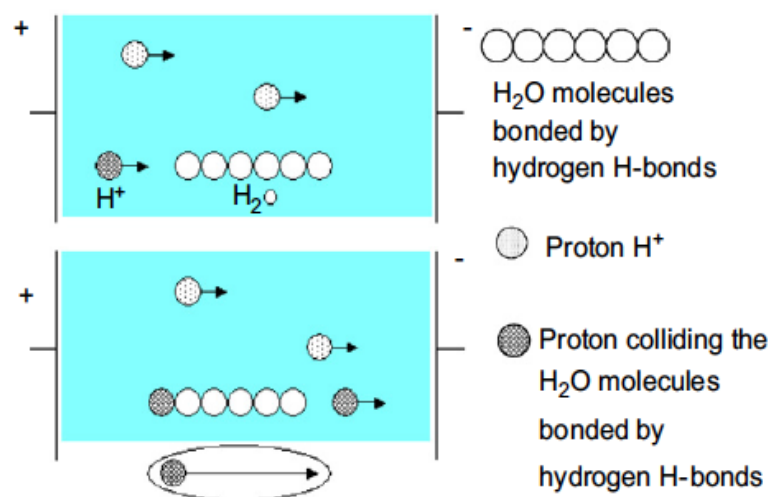


Figura 8

Figura 10. Mecanismo do salto ou “jumping protônico”: As moléculas de água capturam um íon H^+ em uma extremidade e liberam instantaneamente outro íon H^+ na outra extremidade do cluster¹¹⁴

Retirado de: V Elia, E Napoli and R Germano. Homeopathy (2007) 96, 163–169

Mais recente, em 2009, o prêmio Nobel Luc Montaigner e seus colaboradores conseguiram documentar experimentalmente sinais eletromagnéticos produzidos por nanoestruturas aquosas derivadas de sequências de DNA bacteriano. Cepas bacterianas foram filtradas e passaram pelo processo de diluições sucessivas e agitação em vórtice. Esta etapa foi considerada fundamental para a geração de sinais. A seguir os tubos foram lidos através de uma bobina eletromagnética conectada a um computador. Ondas eletromagnéticas foram emitidas por um provável fenômeno de ressonância em um ambiente de frequência muito baixa. Continua em investigação a natureza física dessas nanoestruturas que suportam a ressonância¹¹⁶.

Rey 2003 verificou que a emissão de termoluminescência em soluções de cloreto de lítio e cloreto de sódio na potência 15 cH eram semelhantes aos resultados expressos pelas substâncias originais, as quais apresentavam grande quantidade de moléculas dos sais. E que a água sem adição desses elementos químicos exibia um padrão de termoluminescência característico. Portanto apesar das soluções estarem acima do número de Avogadro e ter a sua estrutura modificada, a luz emitida era específica dos sais originais^{117,118}.

1.3.3.5 HIPÓTESES: NANOESTRUTURAS E NANOBOLHAS

A formação de gases pode afetar fortemente a dinâmica dos líquidos. Em homeopatia, diversas pesquisas vêm demonstrando a existência de nanoestruturas na água e de contaminantes nos medicamentos ultradiluídos. Soluções submetidas a diluições infinitesimais e sucussionadas são estruturalmente diferentes do solvente puro e este processo pode ser evidenciado por meio de estudos de espectroscopia Raman e UV-VIS^{117,119}. Utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, difração de área selecionada e espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado, Chikramane e colaboradores¹²⁰ avaliaram 6 medicamentos homeopáticos originados de metais nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH. Identificaram partículas de metais nos respectivos medicamentos e observaram polidispersividade desses fragmentos metálicos em relação ao tamanho e a forma, em todos os medicamentos e potências testados¹²⁰.

Microbolhas (MBs) e nanobolhas (NBs) são pequenas bolhas com diâmetro respectivo de 10-50 micrômetros e de 10-200 nanômetros, respectivamente (Figura 11)^{121,122}.

Denomina-se epitaxia o fenômeno em que nanopartículas inseridas no solvente durante o processo de diluição formam camadas distintas ao interagirem entre si, sobrepondo-se a um núcleo. Elementos como a sílica desprendida do frasco de vidro ou nanobolhas (NBs), poderiam funcionar como fatores de nucleação⁶⁹.

No entanto, algumas pesquisas já demonstraram que a sílica não é essencial para que se tornem evidentes os efeitos biológicos dos medicamentos homeopáticos, nesse caso, a presença das NBs seria um dos mecanismos plausíveis para justificar ao menos parte dos efeitos da homeopatia nos sistemas vivos⁶⁹. Tendo em vista que fluidos fisiológicos carregam quantidades significativas de gases dissolvidos, como oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂), a nucleação de gases em superfícies hidrofóbicas deve obedecer a um processo comum nos sistemas orgânicos⁹⁵. Demangeat defende a hipótese de que NBs poderiam interagir com o soluto, desempenhando o papel de núcleo no processo de epitaxia^{69,95}.

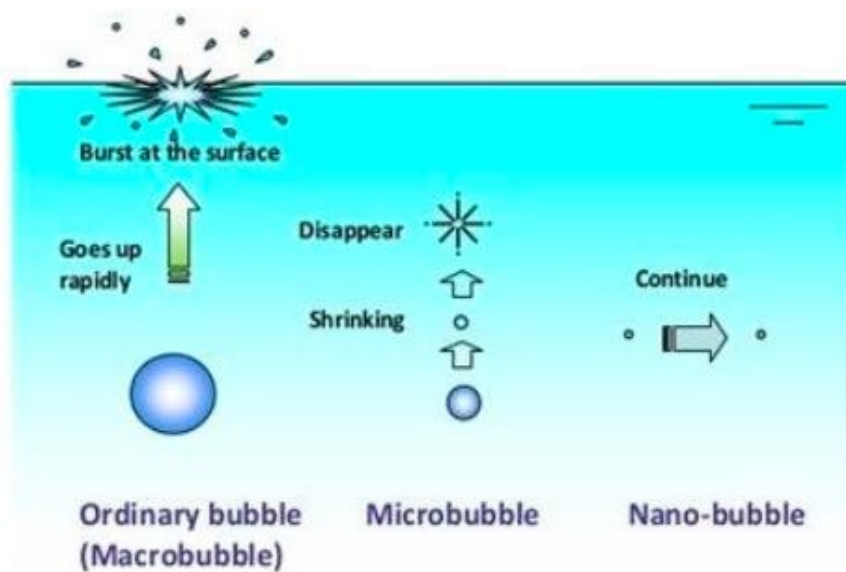


Figura 11. Principais diferenças entre macrobolhas, microbolhas e nanobolhas. Macrobolhas: sobem rapidamente e explodem na superfície. Microbolhas: tendem a diminuir gradualmente de tamanho devido à grande estagnação e entram em colapso com dissolução de gases na água circundante. As nanobolhas permanecem estáveis por meses e não explodem de uma só vez (Takahashi, 2009)¹²¹

Retirado de: Agarwal A, Wun Jern NG, Yu L. Chemosphere 84 (2011) 1175–1180.

Nanobolhas são nano cavidades de gás submetidas ao movimento Browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em um fluido, gás ou líquido, resultante da sua colisão com átomos ou moléculas velozes) e se comportam de forma semelhante às nanopartículas sólidas¹²³. Exibem diversas características físico-químicas e mecânicas, tais como: relação superfície/volume extremamente alta, pequenas forças de flutuação, boa solubilidade de oxigênio na água, geração de radicais livres e liberação de alta quantidade de energia por explosão ou colapso¹²⁴. A análise com espectroscopia de infra-vermelho revelou que a interface líquido/gás consiste em uma camada de ligações duras de hidrogênio semelhantes às encontradas no gelo e hidratos de gás. O tamanho e o potencial Zeta das NBs dependem do pH da solução⁹⁵. O potencial Zeta é um indicador de estabilidade das dispersões coloidais e a maior parte dos materiais macroscópicos ou particulados adquirem carga elétrica em sua superfície quando em contato com um líquido. Portanto, ele representa

a medida da magnitude da repulsão (estabilização) ou da atração (agregação) eletrostática entre as partículas¹²⁵. A Figura 12 exemplifica como uma substância coloidal se comporta em meio líquido.

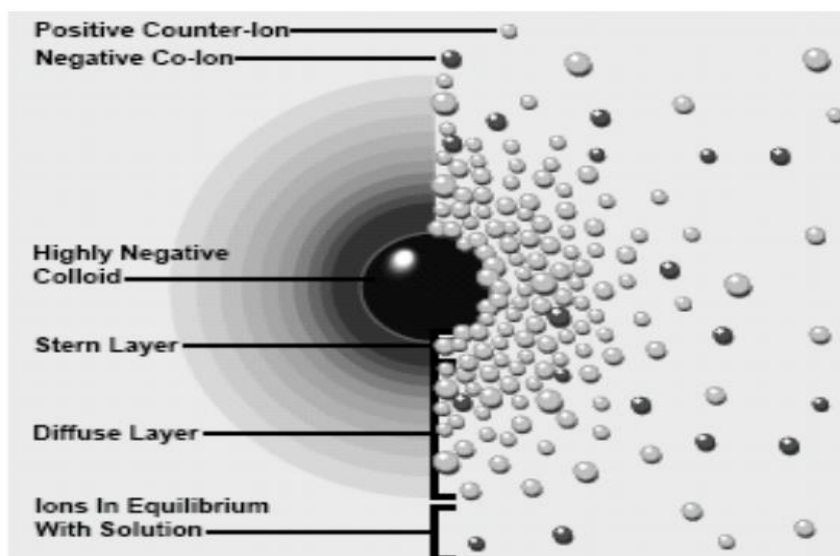


Figura 12. Comportamento de uma substância coloidal no meio líquido: a carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumenta a concentração de contra-íons junto a superfície, carregando as interfaces, e favorece a transferência de gases. Forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido¹²⁵.

Retirado de: <http://www.usp.br/massa/2013/qfl2452/pdf/EstabilidadeColoidal.pdf>

Microbolhas e nanobolhas catalisam reações químicas após sofrerem ação de impactos mecânicos (sucussão). Nos processos que envolvem transferências de elétrons, a espécie que ganha é reduzida e a que perde torna-se oxidada. Partículas carregadas podem acumular essa energia mecânica, alterar ligações covalentes, separar elétrons e produzir radicais livres (grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa)¹²⁶.

Em seres aeróbios, a produção de espécies reativas se faz necessária para a produção de energia e manutenção das funções celulares básicas (fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, mecanismos de defesa celular e síntese de substâncias orgânicas). Porém, em

situações que ocorre um desequilíbrio entre a produção e a eliminação destas espécies reativas, ocorrerá o estresse oxidativo, favorecendo a ocorrência de danos às biomoléculas¹²⁷.

Radical hidroxila (OH^\cdot) e hidrogênio (H^+), quando adsorvidos, influenciam a carga da interface gás-água¹²⁸ e, junto com outros átomos, podem formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O^{2-}) por toda a solução¹²⁹. Durante a cavitação, variações de pressão e o aumento da temperatura induzem a formação principalmente de radical hidroxila, que decompõe vapores de água e gases não condensáveis dentro da NBs¹²⁹.

As NBs encontram-se basicamente sob três formas diferentes¹²⁴ (Figura 13) e podem ser detectadas em um meio líquido por dispersão de luz e outros métodos, em função do seu diâmetro (Figura 14)¹²⁸.

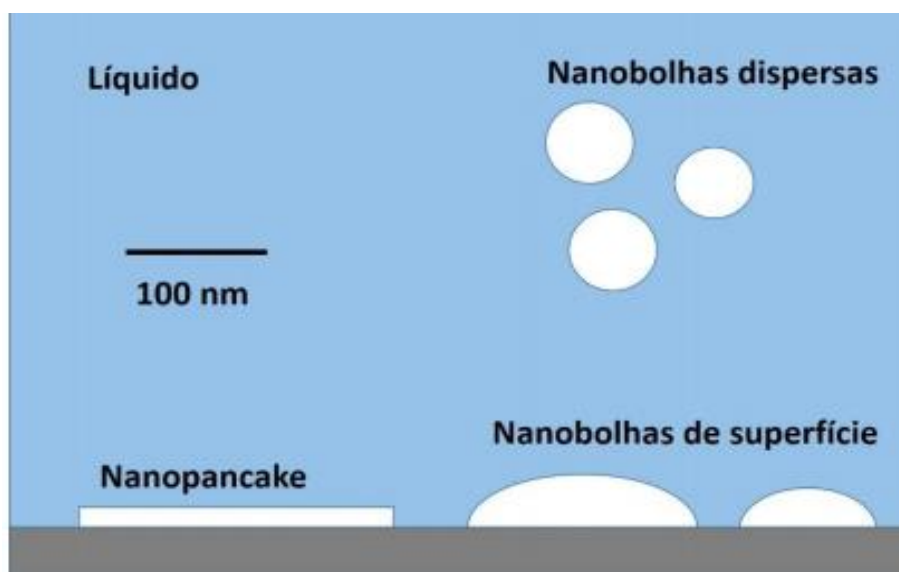


Figura 13. Esquema dos três tipos de ocorrência de NBs (Adaptado de SEDDON *et al.*, 2012). 1 - NBs de superfície formadas na interface sólido-líquido como “calotas” esféricas e com raios de curvatura entre 100-1000 nm; 2 - *Nanopancakes*, como estruturas quase-bidimensionais em uma interface sólido/líquido, com largura de centenas de nanômetros, mas altura inferior a 2 nm; 3 - NBs dispersas (*bulk*), também chamadas a *granel*, no meio de soluções aquosas, com forma praticamente esférica e raios de curvatura entre 50-100 nm^{124,130}.

Retirado de: Etchepare RG. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia da UFRS. Programa de pós-graduação em Engenharia de Minas Metalúrgica e de Materiais. Setembro de 2016.

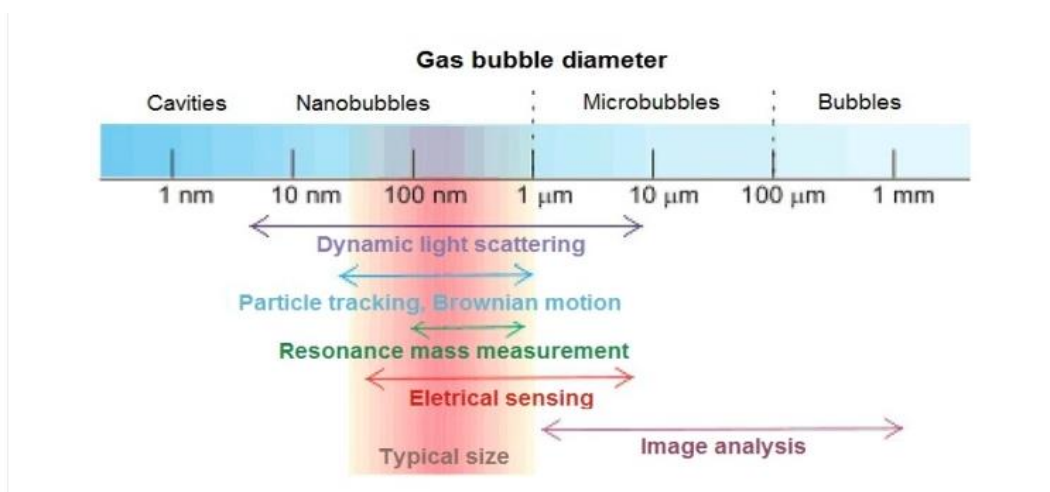


Figura 14. Diferentes métodos que possibilitam o estudo das NBs.

Retirado de: <https://images.app.goo.gl/BHKbqL9var66NYy17>

Diferentes teorias têm sido propostas para explicar a estabilidade das NBs de superfície e NBs dispersas (a granel)^{95,124}. As mais citadas são:

1 – Ligações de hidrogênio nas moléculas de água semelhantes às encontradas nos hidratos de gelo e gás e a adsorção de íons na interface gás-água contribuiriam para a estabilização das NBs.

2- NBs poderiam ser formadas espontaneamente por nucleação do gás dissolvido em contato com superfícies hidrofóbicas, onde seriam estabilizadas por repulsão da água, diminuindo a área da superfície através da qual poderia ocorrer vazão do gás.

3- As bolhas aglomeradas poderiam impedir a saída difusiva de gás.

Cavitação é o processo de formação, crescimento e colapso de MBs e NBs em solução. Estas cavidades de gás, quando submetidas a pressões relativamente altas no líquido em pontos isolados, colapsam e liberam altas quantidades de energia em um curto período (mili ou micro-segundos)^{124,130}. Na cavitação acústica, variações da pressão no líquido são induzidas por ondas

sonoras, na frequência de 16 kHz - 100 MHz. Estas reações podem ocorrer durante a preparação das potências homeopáticas, a depender do procedimento utilizado para dinamização^{95,131}. Estudos demonstram que, quando uma cavidade colapsa, as pressões locais podem atingir valores da ordem de 100-5000 atm e a temperatura a valores entre 1000 – 5000°C^{124,132}. É provável que esses processos melhorem a dissolução do gás (Figura 15)⁹⁵.

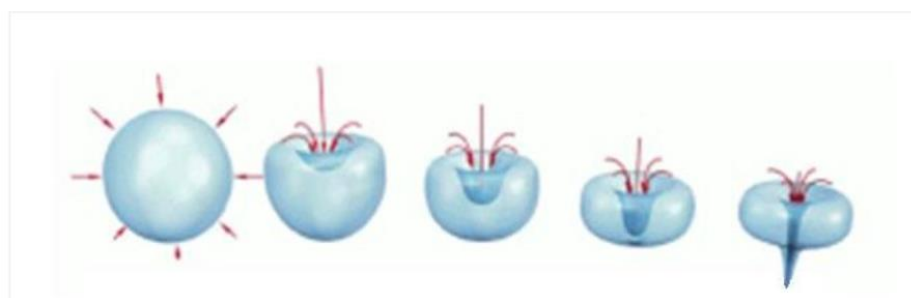


Figura 15. Colapso de uma NB: ao serem submetidas a variações bruscas de pressão em pontos localizados, as NBs sofrem cavitação e colapso, liberando gases para o meio líquido. Também podem colapsar naturalmente, pela perda de íons na sua superfície^{124,130}.

Retirado de: <https://images.app.goo.gl/fD1BPAG8nan3Q4aZA>

Chikramane e colaboradores¹²⁰ observaram que, durante o processo de sucussão, são formadas nanopartículas possivelmente oriundas dos materiais de partida. Esse processo pode decorrer da implosão das cavitações durante o impacto dessas partículas contra a parede do recipiente de vidro e pela tensão cisalhante nos fluidos. É possível que ondas sonoras de alta energia desencadeadas pelo processo da sucussão levem à formação de bolhas com temperaturas e pressões muito elevadas em seu interior¹²⁰.

A hipótese acerca da formação das NBs pode ajudar a compreender de que forma partículas do material de partida poderiam ser encontradas em diluições tão grandes¹²⁰. Uma suposição é que NBs revestidas em sua superfície por conchas de água organizada (clatratos), íons e sílica (se houver), seriam modeladas estruturalmente ao redor do material de origem e transportadas de

diluição a diluição, com aposição de novas NBs a cada passo⁹⁵. Desta maneira, as NBs ascenderiam até a camada superior da solução de onde se retiraria 1% para ser adicionada ao próximo recipiente, em 99 partes iguais do solvente fresco. Ao submeter o novo frasco à sucussão, de modo a se repetir o processo, espera-se que todo o material de partida continue a passar para a diluição seguinte, e como resultado desse processo, as partículas ficariam retidas até nas maiores potências¹²⁰.

Apesar de promissor, o estudo das NBs (e seu papel como estrutura capaz de transmitir a informação nas soluções ultradiluídas) é complexo e bastante controverso, com muitas lacunas para serem investigadas. Nesse contexto, é preciso também levar em consideração os efeitos decorrentes da interação entre a água e o álcool presentes na solução, sobre a formação e estabilidade das NBs. A adição de etanol à água modifica o comportamento e aumenta a complexidade do solvente⁹⁶.

Pesquisas indicam que superfícies submetidas a tratamento com etanol aumentam fortemente a quantidade de NBs no meio aquoso⁹⁵. Porém, o tempo de duração das NB poderia estar relacionado ao percentual de concentração do álcool na solução. Zhang *et al.* (2005) avaliaram a influência do etanol na estabilidade das NBs de forma quantitativa, estudando o papel do gás dissolvido na formação das NBs ao se adicionar um substrato de silício, utilizando técnicas de desgazeificação e Microscopia de Força atômica (AFM). O resultado mostrou que o número de NBs diminuiu com o aumento da concentração do etanol e todas desapareceram em solução mais concentrada do que 20%. Uma das hipóteses para este desfecho, decorre do fato do etanol na solução promover interação hidrofóbica dos substratos que são insolúveis em água, o que poderia dissolver as NBs¹³². Apesar deste estudo não ter utilizado soluções ultradiluídas e dinamizadas como base direciona para a necessidade de mais pesquisas acerca das propriedades físico-químicas da água em soluções hidroetanóides, envolvendo os medicamentos homeopáticos.

O estudo de bolhas em escala nanométrica tem despertado grande interesse pois sua presença em superfícies sólidas imersas em solução aquosa, especialmente em substratos hidrofóbicos, estão presentes em vários tipos de sistemas biológicos, químicos e coloidais. Nanopartículas de drogas, aumentam consideravelmente sua biodisponibilidade. NBs circulam no sistema linfático e

sanguíneo, atravessam membranas, inclusive hematoencefálica, como também induzem respostas imunológicas⁹⁵. Portanto, diferentes áreas de atuação investigam as funções e a melhor forma de otimizar todo o potencial das NBs. Na homeopatia, por sua vez, procura-se respostas quanto ao mecanismo de ação das ultradiluições. Entender a transferência de informação dos solutos por nanoestruturas em todas as faixas de diluição é uma abordagem que tem despertado a atenção, mas ainda há mais dúvidas que respostas.

Os medicamentos homeopáticos são capazes de desencadear respostas biológicas nos organismos vivos, mesmo quando não se detectam moléculas do insumo ativo na sua composição. As hipóteses sobre os mecanismos da transmissão da informação baseiam-se em diferentes formatos plausíveis de memória, mas não se pode descartar a possibilidade de haver, nesse mecanismo, a soma de mais de um fenômeno⁷⁴ (Figura 16).

Ainda sobre a “memória da água”, reproduzo as palavras do Dr. Peter Fisher (*in memoriam*), homeopata, editor da Revista *Homeopathy* e médico da família real britânica: “Fica muito trabalho, ainda, por ser feito, mas neste estágio podemos dizer uma coisa com certeza: a asserção de que a homeopatia é impossível porque a “memória da água” é impossível é errada”^{133,134}.

1.4 O MODELO DA *Artemia salina*

Nos últimos anos o uso de modelos aquáticos ecotoxicológicos têm sido cada vez mais comum, em virtude de sua alta sensibilidade, facilidade reprodutiva e baixo custo¹³⁵. A *Artemia salina* é tradicionalmente usada para esse fim devido à sua relevância ecológica, pois representa um elo fundamental na cadeia alimentar do ambiente marinho e é facilmente cultivada em condições de laboratório¹³⁶.

A *Artemia salina* Leach é um microcrustáceo que ocupa a seguinte posição taxonômica: Filo Artropode, Classe Crustacea, sub-classe Branchiopoda, ordem Anostracea, família Artemidae, gênero Artêmia¹³⁷.

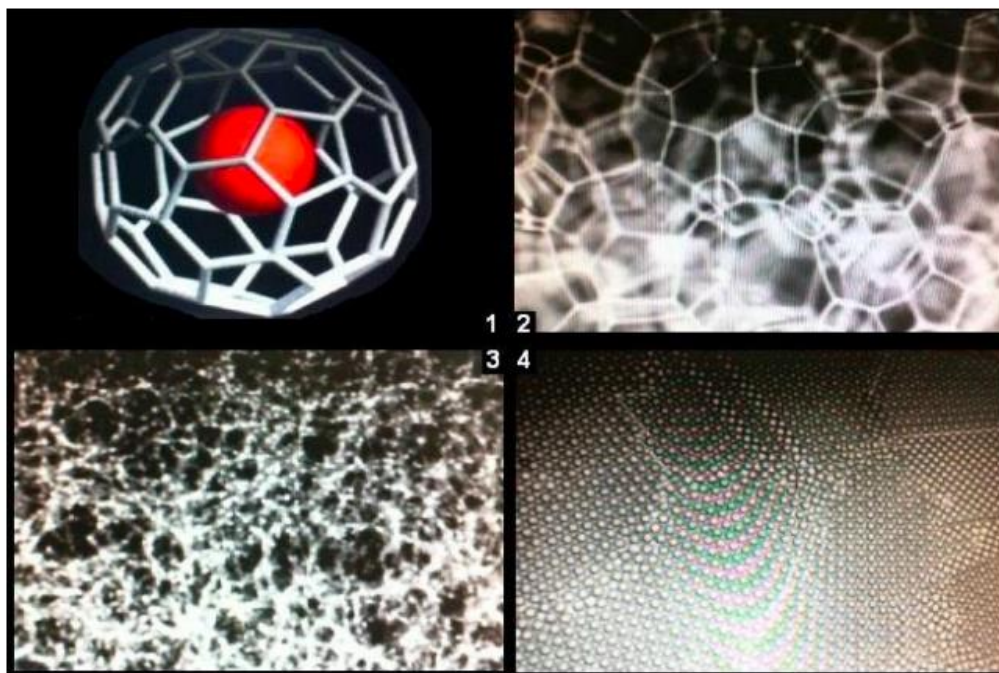


Figura 16. Modelo envolvendo diversas teorias sobre memória da água, exemplificando os fenômenos que ocorrem em uma solução salina submetida a diluição e sucussão, através de diversos mecanismos, tais como: formação e difusão dos gases (nanobolhas), clusters de água, efeitos dos campos eletromagnéticos da água^{107,108,109}. (1) A energia gerada pela sucussão levaria à expansão das moléculas de gás e formação dos clatratos de água, com a presença do soluto no seu interior. (2) Com o decorrer do processo, novos clusters seriam formados, preservando a estrutura molecular mesmo sem o soluto (3). Este processo se repetiria *ad infinitum*, até que (4) todo o volume de água estivesse cheio destes cristais. Para os sistemas vivos, a informação do sal original seria transmitida pela capacidade de gerar uma suposta assinatura eletromagnética, específica ao soluto que lhe deu origem¹⁰⁷.

Retirado de:

<http://aphomeopatia.weebly.com/uploads/3/4/2/5/3425631/homeopatia-como-funciona.pdf>

Na fase adulta, as *Artemias* possuem corpo alongado dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça é formada por dois segmentos unidos que servem de suporte para dois olhos pediculados, um olho náuplio, antênulas e antenas. Nos machos, as antenas são maiores pois desempenham papel importante pré-copulatório (*riding position*). O tórax é formado por onze pares de toracópodos, segmentos estes que desempenham importante papel na locomoção, respiração

e alimentação dessa espécie. O abdome é composto por oito segmentos e nos primeiros estão localizadas as gônadas: ovissaco (útero externo) nas fêmeas e um par de pênis nos machos. O último segmento é bifurcado e ali se encontram o telson e a furca, onde se exterioriza o ânus. Os machos adultos medem de 8 a 10 mm, e as fêmeas 10 a 12 mm de tamanho^{78,79}.

Podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada (partenogenética). A reprodução sexuada acontece por oviparidade, onde os embriões permanecem dentro dos cistos para posteriormente ser eliminados na água, ou por ovoviviparidade, em que náuplios nascem diretamente do ovissaco. O óvulo fertilizado segue até o útero, onde se desenvolve dentro dos cistos. Na presença de condições ambientais favoráveis, em poucas horas inicia-se o processo de rachadura da primeira camada do cisto, levando à exposição do embrião, que permanece envolvido por uma fina membrana aderida ao cisto (fase guarda-chuva). No decorrer do processo, ocorre a liberação do náuplio nadante no seu primeiro estágio larval. Todo o processo transcorre num período entre 24 e 48 horas (Figura 17)^{137,138}.



Figura 17. Cisto, estágio guarda-chuva e náuplio recém- eclodido¹³⁹.
Retirado de: Mayorga, P; Pérez, KR; Cruz, SM; Caceres, A. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20: 897-903.

O jovem náuplio apresenta tamanho de 0,45 mm de comprimento e 0,1 mm de largura, pesando aproximadamente 0,01 mg. Até atingir a idade adulta são observados vários estágios e, após desenvolverem todos os apêndices locomotores, passam a ser chamados de metanáuplios. Na fase pré-adulta, ocorre a formação dos genitais. Aproximadamente em 8 dias ocorrem entre 9 e 19 mudas até a *Artemia* atingir a idade adulta, período este marcado pela capacidade de reprodução^{137,138}.

Uma fêmea adulta em ambiente favorável é capaz de produzir até 300 náuplios ou cistos a cada 5 dias. A *Artemia* é capaz de concluir seu ciclo de vida, a depender das condições climáticas e da água, em até 22 dias (geralmente o fazem em 12 dias) e podem viver de 1 a 6 meses (Figura 18)^{137,138}.

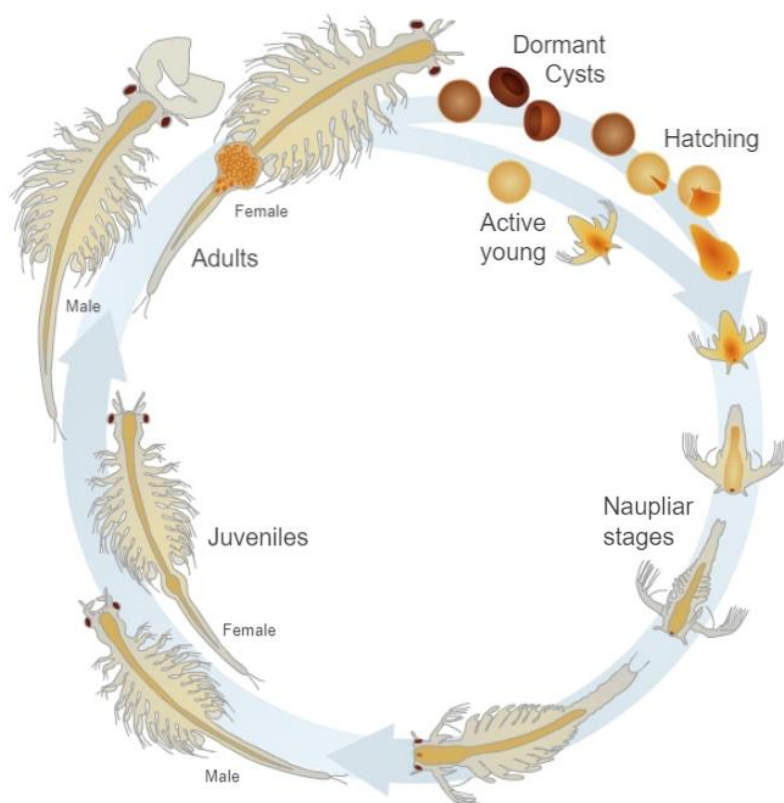


Figura 18. Ciclo de vida da *Artemia salina*¹³⁸.
Retirado de: <https://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/artemia/>

1.4.1 ANATOMIA DO CISTO

A casca do cisto é composta por 5 camadas distribuídas da face externa para a interna (Figura 19). A camada alveolar tem como principal função proteger o embrião de impactos mecânicos e radiação UV e é formada por lipoproteínas, dentre elas destacam-se quitina e hematina. A membrana cuticular externa atua como barreira de permeabilidade, protegendo o embrião de moléculas maiores que o CO₂. Todas essas camadas conferem ao cisto uma espetacular resistência e representam a primeira linha de defesa para os embriões encistados^{140,141}.

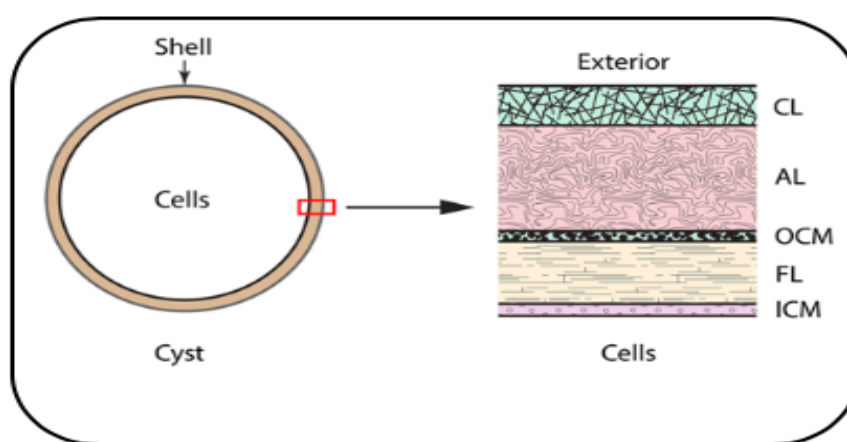


Figura 19. Representação esquemática da casca do cisto da *Artemia salina*. A ultraestrutura da carcaça do cisto apresenta os seguintes elementos em camadas: CL: Camada cortical; AL: Camada alveolar; OCM: Membrana cuticular externa; FL: camada fibrosa; ICM: Camada cuticular interna¹⁴⁰.

Retirado de: MacRae TH. Cell Stress and Chaperones (2016) 21:9–18.

1.4.2 DIAPAUSA

Uma estratégia fisiológica utilizada pela *Artemia salina* para preservar sua espécie de estressores ambientais extremos é a diapausa, que consiste na parada do desenvolvimento do embrião no estágio de gástrula, um estado de baixa atividade metabólica, decorrente de diversos mecanismos moleculares^{142,143,144}.

A diapausa é um processo dinâmico que acontece em 3 etapas: iniciação, manutenção e término. No início acontecem mudanças na expressão gênica, com síntese de proteínas e aumento da atividade proteica. A manutenção

coincide com supressão metabólica e tolerância máxima ao estresse. E ao término, diante de condições ideais de temperatura, aeração, luminosidade e umidade, o metabolismo é retomado, dando continuidade ao crescimento do embrião, ruptura da casca do cisto e nascimento do náuplio^{145,146}.

Os embriões encistados são capazes de sobreviver a condições adversas de temperatura (frio e calor extremos), escassez de alimento, diminuição de oxigênio, salinidade extremamente alta (próximo ao ponto de precipitação do sal), radiações ionizantes, exposição a produtos químicos e vários anos de anóxia¹³⁸.

Diante de condições ambientais e fisiológicas adversas, durante a diapausa ocorrem reações bioquímicas nas diversas camadas do cisto, que são responsáveis pela tolerância desses organismos ao estresse. Experimentos recentes revelaram a composição molecular da concha e como ela contribui para a permeabilidade seletiva e resistência à radiação UV¹⁴⁰.

Nos processos de diminuição progressiva ou ausência de água no ambiente, alguns organismos entram em anidrobiose, estado no qual podem suspender ou reduzir sua atividade metabólica para suportar longos períodos de desidratação ou dessecação. Nesta fase ocorre a síntese de dissacarídeos não redutores de glicose (trealose nos animais e sacarose nos vegetais) que envolvem macromoléculas, evitando mudanças estruturais na célula¹⁴⁷. Os cistos de *Artemia salina* contêm grandes quantidades de trealose e, durante uma situação de dessecação, esse açúcar atua de forma semelhante a uma molécula de água, formando ligações de hidrogênio com fosfolipídeos e proteínas e produzindo uma espécie de *biovidro* (processo chamado de *vitrificação*). Dessa forma, mesmo com as reações bioquímicas paralisadas, as macromoléculas mantêm sua estrutura, preserva a conformação anatômica das membranas celulares e das proteínas e permanecem fixadas em um meio estável. A trealose também serve como fonte de energia para o embrião ao término da diapausa^{148,149}.

O proteoma do cisto na diapausa inclui enzimas metabólicas, antioxidantes, proteínas de ligação, proteínas estruturais, transportadores, fatores de tradução, receptores e transdutores de sinal¹⁵⁰. Proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA - *Late Embryogenesis Abundant*) são proteínas não estruturadas presentes em muitos organismos anidrobióticos (capazes de

produzir biovidro para sobreviver ao *stress* ambiental) e são acumuladas em resposta ao déficit de água, no processo de dessecação extrema. Nos embriões de *Artemia salina* essas proteínas são encontradas no citoplasma e nas mitocôndrias, sendo específicas da diapausa¹⁴⁹.

Essas moléculas podem atuar como antioxidantes, se ligando a íons, estabilizar membranas ao interagir com fosfolipídios, fortalecer o processo de vitrificação junto com a trealose e proteger organelas e proteínas celulares, formando algo semelhante a um escudo molecular (Figura 20). Durante a desidratação podem inibir a agregação entre proteínas enoveladas através de barreiras físicas e/ou eletrostáticas que impedem interações proteicas e evitar a formação de agregados intracelulares^{140,149}.

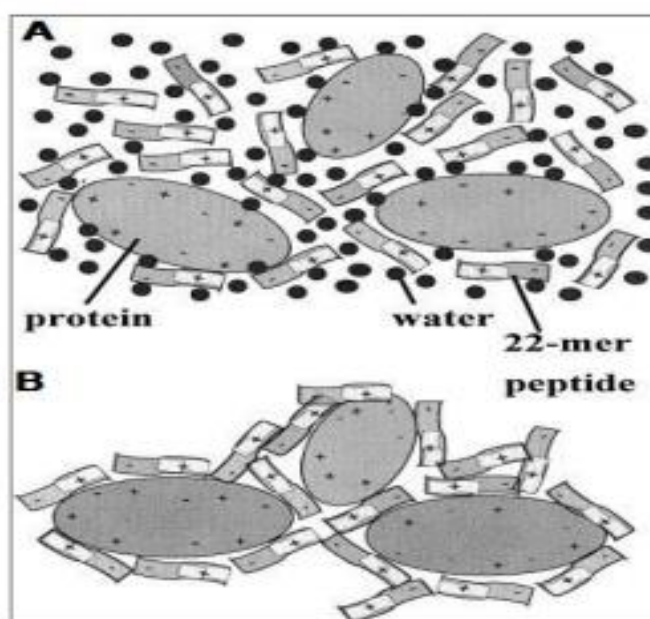


Figura 20. Formação do “escudo molecular” pelas proteínas LEA. Em A: Os círculos pretos representam moléculas de água em grande quantidade. Note-se a disposição das proteínas dentro da célula, como também a dos peptídeos derivados de uma LEA (fitas com polaridades + e -). **Em B:** Quando ocorre a dessecação e a disponibilidade de água fica próxima de zero, as proteínas LEA aderem à superfície das proteínas estruturais formando uma espécie de “escudo molecular” em substituição das moléculas de água¹⁴⁹.

Retirado de: Gustavo Borges. Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em *Panagolaimus superbus*: efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento. Ribeirão Preto: USP, FICCRP, 2013.

Chaperonas moleculares independentes de ATP são proteínas encontradas também em abundância nos cistos, especificamente durante a diapausa. Dentre essas, destacam-se 3 pequenas proteínas de choque térmico (P26, ArHsp21 e ArHsp 22) e a artemina. Estas desempenham diferentes funções na fisiologia e no desenvolvimento dos cistos e possivelmente trabalham em conjunto, ao ligarem diferentes substratos de macromoléculas ou funcionarem como um complexo de moléculas efetoras^{140,151,152}.

Dentre essas, a P26 representa 7% da proteína solúvel no cisto e a Artemina, semelhante à ferritina, é a segunda proteína mais abundante no cisto. Essas chaperonas protegem as proteínas envolvidas nos principais processos celulares (do metabolismo à transcrição, tradução, movimento, transporte e sinalização), bem como as proteínas que regulam essas atividades (Figura 21)^{140,153,154}.

Portanto, tais proteínas são essenciais para a vida celular, pois evitam a desnaturação irreversível de outras proteínas durante o estresse provocado pela dessecação, calor e congelamento. Também influenciam o desenvolvimento do embrião, a interrupção da diapausa e a liberação dos cistos pelas fêmeas¹⁴⁰.

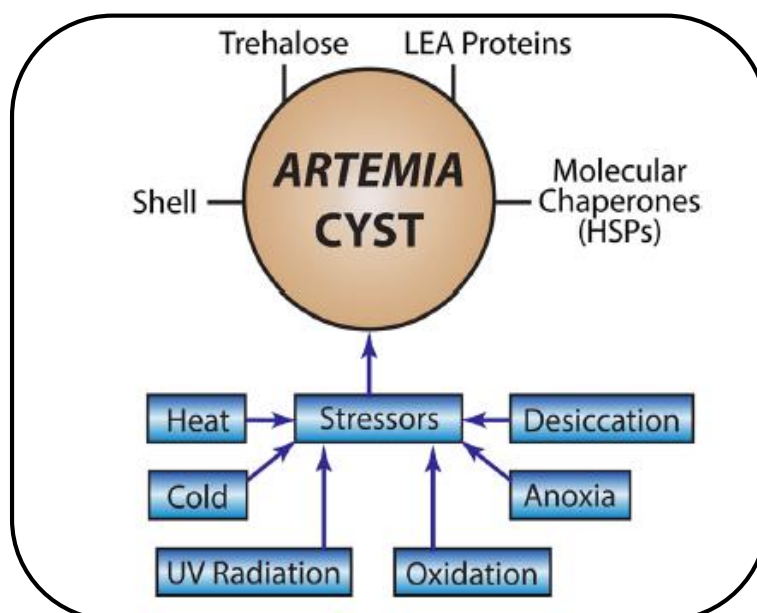


Figura 21. Fatores estressores atuando sobre os cistos da *Artemia* e os principais mecanismos envolvidos durante a diapausa¹⁴⁵.

Retirado de: King AM, Toxopeus J, MacRae TH. FEBS Journal 280 (2013) 4761–4772.

Todas estas adaptações funcionam em conjunto e proporcionam aos cistos de *Artemia salina* muita tolerância ao estresse, raramente encontrado em qualquer estágio da história de vida de outro animal. Portanto, ao permanecer no estágio de cisto, é possível que a *Artemia* esteja protegida dos agressores do meio externo onde se encontra, até que sejam retomadas as condições ambientais propícias a sua eclosão¹⁵⁰.

Em razão de filtrar uma grande quantidade de água por hora, a *Artemia salina* fica exposta a um maior risco de poluentes e por isso apresenta uma boa sensibilidade para avaliar o impacto de contaminantes, sendo um bom modelo experimental para esse fim. As larvas de *Artemia salina* são sensíveis a substâncias tóxicas e, portanto, são muito utilizadas em ensaios de toxicidade de ecossistemas marinhos¹³⁵. Outras vantagens de se utilizar *Artemia salina* em pesquisas de toxicologia são: ciclo de vida curto, alta fecundidade (obtenção de grande quantidade de organismos para os procedimentos), serem de tamanho pequeno e resistentes à manipulação. Acrescenta-se ainda que o uso de cistos como fonte primária implica em trabalhar com indivíduos de mesma idade e genótipo, diminuindo a variabilidade da amostra, além de serem facilmente adquiridos¹³⁶.

1.5 CICLO DE VIDA DO ANIMAL MARINHO E FASES DA LUA

Sabe-se que a Lua é o único satélite natural da Terra e que suas fases têm origem na sua posição em relação ao sol. Vários estudos sugerem que, em ambientes marinhos, os principais fatores que afetam o comportamento diário dos animais são os ciclos claro e escuro, as marés e os ciclos lunares. Ritmos lunares ocorrem principalmente em espécies marinhas¹⁵⁵.

As marés são consequência da atração gravitacional da Lua e do sol sobre a Terra. A luz e as marés são as variáveis ambientais mais afetadas pelo ciclo lunar, ocorrendo com periodicidade lunar (diária), semi-lunar (14 dias) ou mensal (29 dias)^{156,157}.

A Lua apresenta quatro fases: nova, crescente, cheia e minguante, que ocorrem nessa ordem durante um mês sinódico ou luação, cuja duração é de aproximadamente 29,5 dias. Este corresponde ao intervalo de tempo que a Lua leva para completar uma volta ao redor da Terra. Cada fase da Lua dura em

média 7 dias e sua forma aparente vai depender de mudanças na iluminação produzidas pelo sol (Figura 22)^{156,157}.

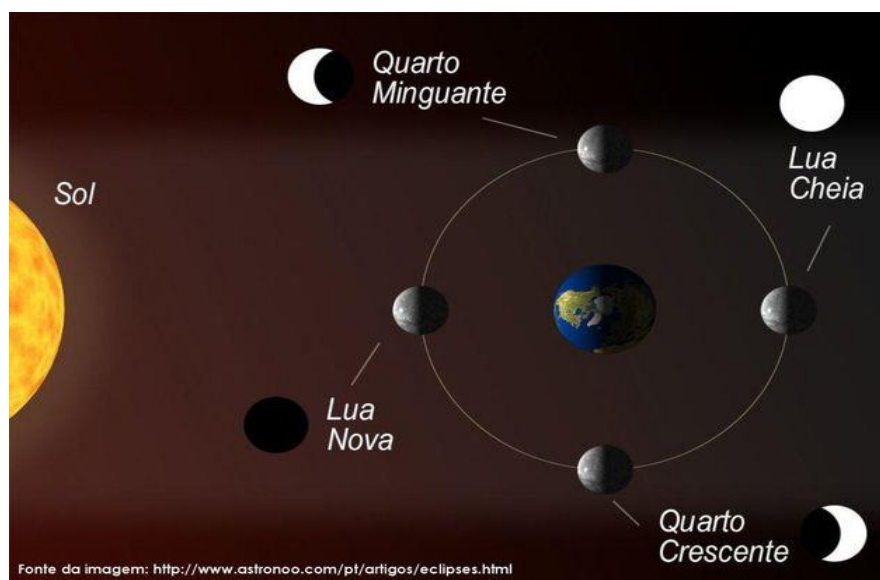


Figura 22. Fases da lua.

Retirado de: <https://images.app.goo.gl/rkBcmnB7YuYs1wYu5>

A Lua ao realizar o movimento de translação ao redor da Terra, vai refletindo as variações da luz do sol, na sua superfície. Os raios luminosos atingem a órbita da Lua e, dependendo da angulação produzida pelas posições entre sol, Lua e Terra, resultam nas diferentes fases da Lua^{156,157}.

Em um artigo de revisão, Takemura *et al.* (2010), ao relatarem o comportamento reprodutivo em várias espécies de peixes, observaram que eventos reprodutivos nestes animais estavam frequentemente sincronizados com mudanças periódicas de acordo com os ciclos relacionados à Lua, inclusive sugerindo que algumas espécies, no seu processo evolutivo, desenvolveram uma sintonia entre seu relógio biológico e a periodicidade lunar¹⁵⁸.

Camargo *et al.* (2002), ao estudar por 2 anos os efeitos dos ciclos lunares na densidade de *Artemia salina* em ambientes hipersalinos, não encontraram diferenças significativas para este parâmetro entre as fases da Lua. Porém, chamou atenção para as mudanças nas faixas de temperatura que foram

maiores na Lua cheia quando comparada à Lua nova. Este fato impactou na distribuição de *Artemia salina* na coluna de água à noite (temperaturas mais baixas) comparadas com o dia (temperaturas mais quentes)¹⁵⁹.

Mohamed, 2020, estudou os efeitos de isoterápico preparado a partir de cloreto de chumbo em *Artemia salina* exposta ao mesmo sal. Para isto, cistos foram expostos ao cloreto de chumbo e tratados com seu isoterápico ou água succionada (controle) por 48 horas, para observar a possível interferência das fases da Lua e dos tratamentos na eclosão dos cistos e viabilidade dos náuplios. Concluiu que o efeito protetivo sobre a eclosão dos cistos foi mais evidente na Lua cheia nos grupos tratados com diferentes preparações succionadas¹⁶⁰.

Portanto incluir a variável “fases da Lua” nos estudos com animais marinhos pode contribuir para a melhor compreensão dos resultados analisados pela exclusão (ou não) de variáveis de confusão.

1.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

1.6.1 MEV – EDS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é considerado um instrumento multifuncional porque, além de fornecer uma imagem tridimensional de alta performance na profundidade do foco, permite a combinação da análise microestrutural com a microanálise química. Apresenta alta resolução, variando de 1 a 5 nm, podendo ser aplicado em diferentes tipos de análises. Utiliza-se geralmente aumento até 10.000 vezes, mas a depender do aparelho e do material, a imagem pode chegar a 900 000 vezes¹⁶¹. Durante a análise, em condições de vácuo, um fino feixe de elétrons é irradiado sobre a amostra (por área ou microvolume) e os sinais emitidos vão sendo modificados de acordo com as variações da superfície, de maneira a gerar uma imagem eletrônica de varredura^{161,162}. Os detalhes em tons de cinza, que aparecem nas micrografias, representam a superfície ionizada da amostra^{162,163}.

Atualmente quase todos os MEV são acoplados ao sistema de EDS (*Energy Dispersive System*), otimizando a análise das amostras ao determinar qualitativa e semi-quantitativamente a composição dos elementos químicos ali presentes, desde carbono até urânio. Esse limite de detecção é variável, em

torno de 1%. As amostras que não conduzem corrente elétrica, precisam ser metalizadas antes da análise no MEV/EDS para fixação de um material condutor, geralmente ouro ou carbono, para que o processo seja concluído^{162,163}.

1.6.2 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Espectro é definido como um conjunto de cores semelhantes a um arco-íris na seguinte ordem: violeta, azul, verde, amarelo, alaranjado e vermelho. É formado pela decomposição de uma luz composta, por exemplo, a branca em suas cores constituintes. A radiação ultravioleta foi descoberta no século XIX, ao se verificar que além do extremo violeta do espectro, existia uma radiação não visível aos olhos humanos, mas que apresentava forte ação fotoquímica¹⁶⁴.

Espectrofotometria UV-VIS é um método biofísico que se baseia nas medidas de absorção da radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta e visível do espectro, em função do comprimento de onda, e que quantifica a luz absorvida pela amostra. Pode ser correlacionada com a concentração e/ou propriedades estruturais da substância em análise, dissolvida em meio líquido. Seus resultados são produzidos pela interação da matéria com a energia radiante^{165,166}. Os princípios que regem a espectrometria e calorimetria são regidos pelas Leis de Lambert-Beer. Segundo Lambert, “a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente”. E Beer: “a intensidade do feixe de luz monocromática decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente”¹⁶⁴. Apresenta boa sensibilidade, baixo custo, fácil operação e é amplamente usada em diversas áreas, tais como química, biologia, física, bioquímica, engenharia, agricultura e análises clínicas^{166,167}.

Na radiação ultravioleta o comprimento de onda é inferior a 400 nanômetros. A radiação visível compreende comprimentos de onda no intervalo de 400 a 800 nm. O espectro de absorção gera um gráfico de absorbância *versus* o comprimento de onda, onde as curvas de absorção denotam uma espécie de “impressão digital” de substâncias que podem ser identificadas e/ou quantificadas a partir da medição da absorção e transmissão de luz que passa através da amostra. Para que uma molécula absorva a radiação UV-VIS é

necessário a presença de grupos cromóforos na solução^{165,166,168}. Estes contêm muitos elétrons com capacidade para absorver energia (ou luz), na região do ultra-violeta /visível, sendo responsável por sua cor. A Figura 23 explica como funciona o espectrofotômetro¹⁶⁹.

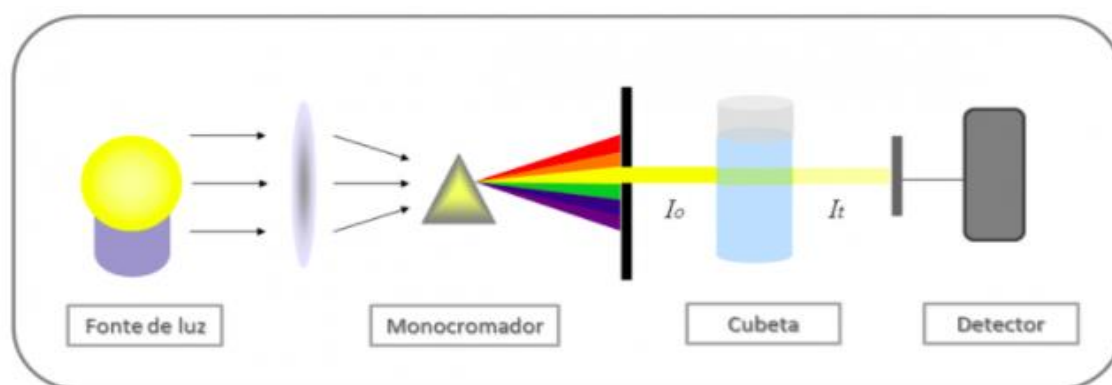


Figura 23. Princípios de funcionamento do equipamento: Uma amostra é colocada dentro do espectrofotômetro. Uma fonte de luz incide sobre um dispositivo (monocromador) que separa a luz em cores, ou seja, comprimentos de onda individuais. Uma fenda ajustável permite apenas que um comprimento de onda específico passe através da solução da amostra. A luz que passa através da amostra é lida pelo detector¹⁶⁵.

Retirado de: <https://images.app.goo.gl/UBThvb7yh7cf4s9W8>.

1.6.3. ESPECTROFOTOMETRIA COM CORANTES SOLVATOCRÔMICOS

Método descrito por Steven Cartwright que desenvolveu sistemas químicos baseados na utilização de corantes solvatocrômicos, capazes de detectar efeitos replicáveis em soluções diluídas e sucussionadas por meio de mudanças nas faixas de absorbância do próprio corante, que ocorrem na parte visível do espectro eletromagnético^{92,170,171}.

Segundo o autor, as potências homeopáticas podem ser de natureza eletromagnética. Isso sugere um papel da água como condutora elétrica oscilatória que pode atuar na propagação e/ou manutenção do sinal do medicamento, em função da maior ou menor estabilidade das ligações de

hidrogênio, formadas durante o processo de dinamização^{92,170,171}. Todos os corantes solvatocrômicos são dipolares e, ao interagirem com o solvente onde foi preparada a potência homeopática (em geral, a água), desencadeiam fenômenos de agregação ou desagregação das moléculas, o que implica em mudanças específicas no espectro da absorbância das amostras⁹². Esses corantes são caracterizados por possuírem um grupo doador e outro receptor de elétrons, podendo se comportar negativamente ou positivamente, ao absorver comprimentos de ondas mais longos, ou cada vez menores, respectivamente^{92,170}. À medida que a polaridade do solvente diminui, picos de absorbâncias diferentes para um mesmo corante podem ser expressos, a depender do meio em que foram diluídos, como por exemplo água, álcool terci-butilíco e etanol¹⁷¹. Tal é o fenômeno do solvatocromismo. Portanto, os corantes solvatocrômicos atuam como sondas reveladoras que indiretamente podem evidenciar diferentes padrões de ressonância elétrica entre o solvente e as potências homeopáticas inseridas na cubeta, sendo uma importante ferramenta na compreensão dos fenômenos físico-químicos que acontecem nas soluções ultradiluídas¹⁷² (Figura 24).



Figura 24. Espectrofotômetro e corante ET33.
Imagem cedida por Leoni V Bonamin

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Verificar a possível proteção de *Artemia salina* exposta ao arseniato de sódio em diferentes concentrações (1,5 mg/mL, 3,0 mg/mL e 6,0 mg/mL) pela adição de isoterápicos na água do mar em condições laboratoriais.

2.2 ESPECÍFICOS

1 - Avaliar os náuplios quanto à sua mobilidade e sobrevivência, bem como taxa de eclosão de cistos após adição de diferentes diluições homeopáticas do isoterápico de arseniato de sódio na água;

2 - Identificar possíveis interferências das fases da Lua, nos desfechos analisados, haja vista *Artemia salina* ser um animal marinho;

3 - Analisar as propriedades físico-químicas dos medicamentos utilizados e da água, pelo método de Cartwright, selecionando os corantes mais adequados para eventual rastreamento desse tipo de amostra;

4 – Identificar, na água, presença de micropartículas precipitadas contendo arsênio, por meio da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS);

5 – Identificar, na água, a presença de arsênio solúvel pelo método ICP/OES, para fins de comparação.

3 JUSTIFICATIVA

Face aos pressupostos apresentados acima e, considerando-se que a homeopatia se apresenta como uma ciência passível de ser aplicada também ao meio ambiente, o presente estudo foi elaborado para avaliar a hipótese de que a adição do isoterápico preparado a partir do arseniato de sódio à água do mar, onde os microcrustáceos foram expostos ao mesmo sal em diferentes concentrações, poderia diminuir os efeitos tóxicos produzidos sobre a eclosão dos cistos, a viabilidade e mobilidade dos náuplios. E inclusive poderia modificar certas propriedades físico-químicas da água, como o comportamento dipolo e a relação entre arsênio solúvel e precipitado, de modo a verificar se apresentam correspondência com os efeitos biológicos observados, dando as primeiras diretrizes sobre os mecanismos de ação envolvidos. Sendo assim, o presente trabalho se justifica pela possibilidade da homeopatia, na forma de preparações isoterápicas, ser estabelecida também como um provável recurso de remediação do meio ambiente (da água em especial), complementar a outras medidas, após a exposição a poluentes diversos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo não se utilizou animais vertebrados, sendo o microcrustáceo *Artemia salina* um modelo alternativo. Conforme legislação nacional (CONCEA) e internacional (*EU Directive 2010/63/EU for animal experiments*), a análise do projeto pelo comitê de ética é dispensável nesses casos.

4.1 PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DOS ISOTERÁPICOS

As matrizes dos isoterápicos foram preparadas a partir da solução mãe de arseniato de sódio, ou AS (arsênico pentavalente, *Sodium arsenate dibasic heptahydrate*, SIGMA-ALDRICH, CAS Number 10048-95-0) no laboratório da farmácia de manipulação homeopática HN Cristinano, em São Paulo, credenciada pela ANVISA para manipulação de produtos homeopáticos.

Todos as preparações foram feitas de acordo com a técnica prevista na Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª edição¹⁷³ (2011) e pela instrução normativa nº 11 do Ministério da Agricultura¹⁷⁴ (2014).

As matrizes foram preparadas nas potências 5 cH, 29 cH e 199 cH, as quais correspondem à diluição do isoterápico anterior àquela utilizada no experimento (diluição ou potência de trabalho). Esses insumos foram preparados em etanol 30% (v/v), em frascos de vidro âmbar tipo II, ocupando o volume 2/3 da capacidade do recipiente e submetidos a 100 sucussões verticais, em cada etapa, por método automatizado.

4.2 PREPARO DOS ISOTERÁPICOS DE TRABALHO

A partir das matrizes descritas acima, foram obtidos os isoterápicos nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH, as quais foram escolhidas para este experimento. Tais potências foram escolhidas para uma abordagem exploratória pois são as mais usadas na prática clínica homeopática, conforme descrito na introdução. O preparo dos isoterápicos ocorreu no dia anterior ao experimento, em cabine de fluxo laminar, com água pura estéril (obtida em sistema de purificação Direct-Q3, com SmartPark Direct Q3 e filtros Biopak 0,22 micrômetros, MERCK – MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha). Para cada 9,9 mL de água purificada estéril foram colocados 100 µL da respectiva matriz em frasco âmbar e submetidos à sucussão, caracterizando a última passagem de diluição para obtenção da potência de trabalho. Esse procedimento foi realizado para todas as matrizes e também para o álcool a 30%, fornecido pela própria farmácia participante. Essa preparação passou a ser denominada *Ethilicum* 1 cH, sendo utilizada como medicamento de comparação. Todos os frascos contendo as diluições de trabalho foram submetidos ao processo de sucussão automática em braço mecânico Denise® (AUTIC, São Paulo, Brasil).

Os controles foram feitos com água purificada estéril e água purificada estéril sucussionada pelo mesmo processo. A água sucussionada foi incluída para avaliar possíveis efeitos exclusivos da sucussão, decorrentes da agitação dos líquidos.

Ao final desta etapa, a concentração de álcool em cada poço contendo água do mar e cistos de *Artemia salina* foi de 0,015%, descartando-se os efeitos inespecíficos do álcool nos organismos testados.

4.3 CODIFICAÇÃO DOS FRASCOS

Os frascos contendo os isoterápicos de arsênio nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH, denominados *Arsenicum*, e os frascos de *Ethilicum* 1 cH tiveram suas etiquetas originais trocadas por funcionário não envolvido diretamente com o experimento. Esses frascos foram nomeados aleatoriamente com as letras A, B, C e D, para condução dos experimentos em cego. Água sucussionada e água estéril permaneceram com as etiquetas originais, para que pudessem ser alocadas separadamente na placa de cultura, sem possibilidade de contaminação acidental entre ambos os controles.

As etiquetas originais e os respectivos códigos permaneceram em envelope lacrado e estiveram inacessíveis durante todo o experimento. Os códigos foram revelados após o término da análise estatística.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi delineada em modelo de *Artemia salina*, utilizando o arseniato de sódio [$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$] como substância tóxica desafiante. As análises foram realizadas no Laboratório de Organismos Aquáticos do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP). Abaixo estão descritas as etapas dos experimentos.

4.4.1 ECLOSÃO DOS CISTOS E VIABILIDADE DOS NÁUPLIOS

4.4.1.1 PREPARO DA ÁGUA MARINHA ARTIFICIAL, DO ALIMENTO E CULTIVO DA *Artemia salina*

A água marinha artificial foi preparada com 1L de água destilada e 30g de sal marinho Ocean Fish®, sob agitação constante¹⁴⁰. No preparo do alimento, a cada 0,5 g de fermento biológico Fleishchimann® (*Saccharomyces cerevisiae*) foram acrescentados 10 mL de água marinha sintética. A seguir, esse conteúdo foi homogeneizado e transferido para frasco âmbar devidamente identificado e armazenado na geladeira.

4.4.1.2 DEFINIÇÃO DO PERCENTUAL DA CONCENTRAÇÃO LETAL

Para a definição das concentrações usadas no desafio, uma cultura de *Artemia salina* foi preparada com a inserção de 0,6 g de cistos e 4 mL de alimento já preparado em 396 mL de água do mar artificial. Em seguida, a água contendo os cistos foi submetida à técnica padrão de oxigenação, luminosidade e temperatura, para promover a eclosão em 48 horas.

Num primeiro estudo piloto, foi instituído um protocolo para definir a concentração letal 10% (CL 10), realizando-se diluições seriadas na proporção 1:2 a partir da solução mãe (10 mg/mL) de arseniato de sódio, distribuídas em 11 tubos. Cada tubo recebeu 900 µL de água salina e 100 µL de alimento. Ao tubo 1 foi adicionado 1 mL de intoxicante (solução mãe) e transferido 1 mL para o tubo 2, do tubo 2 transferido 1 mL para o tubo 3 e assim sucessivamente até o tubo 11. O objetivo dessas diluições, na proporção 1:1, foi obter diferentes concentrações do intoxicante em escala linear (Tabela 2).

Tabela 2. Estudo piloto: Concentrações de arseniato de sódio (AS) obtidas após diluição da solução mãe (10 mg/mL de AS).

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
% AS	50	25	12,5	6,25	1,56	0,78	0,39	0,19	0,095	0,047	0,023
AS mg/mL	5,0	2,5	1,25	0,625	0,156	0,078	0,039	0,019	0,009	0,004	0,002

A próxima etapa foi realizada numa placa de 96 poços e o conteúdo de cada tubo (100 µL) foi transferido para seu poço correspondente (de 1 a 11), acrescidos de 100 µL de água salina com náuplios. Desta forma, em cada poço a concentração do agente intoxicante foi equivalente a 50% da concentração do tubo que lhe deu origem. A coluna 12 correspondeu ao controle não tratado. A análise dos poços e contagem dos náuplios foi realizada 2 horas após a exposição. O cálculo da viabilidade englobou a contagem de náuplios vivos e mortos em cada poço, seguida da aplicação da fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de náuplios vivos (em cada poço)}}{\text{número de náuplios totais (mortos + vivos)} \times 100$$

Os poços de A até F, foram representativos das repetições de cada tratamento. A Tabela 3 representa os resultados:

Tabela 3. Estudo piloto 1 - protocolo CL 10. Análise da viabilidade de náuplios expostos a diferentes concentrações de AS

POÇOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VIVOS	156	168	155	137	116	154	124	120	113	129	98	108
MORTOS	9	9	11	16	13	12	10	12	15	8	10	7
TOTAL	165	177	166	153	129	166	134	132	128	137	108	175
VIABILIDADE %	94,54	94,92	93,37	93,37	89,54	92,77	92,53	90,90	94,16	94,16	90,74	93,91

Notou-se que o índice de viabilidade dos náuplios foi muito alto em todas as diluições e, diante deste resultado, optou-se por estabelecer outro protocolo com proporções em maior escala, com a finalidade de identificar a concentração ideal para o desafio.

Neste novo ensaio (piloto 2), foram preparadas duas placas utilizando diferentes concentrações de AS a partir da solução mãe: 1ª coluna (5,0 mg/mL); 2ª coluna (6,0 mg/mL); 3ª coluna (7,5 mg/mL) e 4ª coluna (9,0 mg/mL) e 5ª coluna (controle não exposto). O volume total de cada poço foi 100 µL. Em cada coluna realizou-se 5 repetições (poços de A – E), conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Estudo piloto 2 - protocolo CL>10. Distribuição de diferentes concentrações de AS na placa de 96 poços

COLUNA	1	2	3	4	5
POÇO					
A	100 µL As + 100 µL náuplios	120 µL As + 80 µL náuplios	150 µL As + 50 µL náuplios	180 µL As + 20 µL náuplios	100 µL náuplios + 90µL água salina + 10 µL de alimento.
B	100 µL As + 100 µL náuplios	120 µL As + 80 µL náuplios	150 µL As + 50 µL náuplios	180 µL As + 20 µL náuplios	100 µL náuplios + 90µL água salina + 10 µL de alimento.
C	100 µL As + 100 µL náuplios	120 µL As + 80 µL náuplios	150 µL As + 50 µL náuplios	180 µL As + 20 µL náuplios	100 µL náuplios + 90µL água salina + 10 µL de alimento.
D	100 µL As + 100 µL náuplios	120 µL As + 80 µL náuplios	150 µL As + 50 µL náuplios	180 µL As + 20 µL náuplios	100 µL náuplios + 90µL água salina + 10 µL de alimento.
E	100 µL As + 100 µL náuplios	120 µL As + 80 µL náuplios	150 µL As + 50 µL náuplios	180 µL As + 20 µL náuplios	100 µL náuplios + 90µL água salina + 10 µL de alimento.
ARSENIATO DE SÓDIO	5,0 mg/mL	6,0 mg/mL	7,5 mg/mL	9,0mg/mL	BRANCO (não exposto)

A análise dos poços e a contagem dos náuplios foi realizada 2 horas após, utilizando lupa digital (Microscópio Digital C/ Zoom 1000x R Câmera 2.0 Mega Pixels USB 6 Leds, China), para identificação da motilidade naupliar, principal critério de viabilidade. O cálculo da viabilidade para cada concentração foi feito conforme fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de náuplios vivos (em cada poço)}}{\text{número de náuplios totais (mortos + vivos)} \times 100$$

Os índices de viabilidade, para cada concentração de arseniato de sódio testada, estão expressos nas Tabela 5.

Tabela 5. Percentual (%) médio de viabilidade segundo concentração de AS por poço.

Concentração	Viabilidade média (em duas placas)
5,0 mg/mL	51%
6,0 mg/mL	52,8%
7,5 mg/mL	49,6%
9,0 mg/mL	43,2%

4.4.1.3 PROTOCOLO PARA PREPARO DAS PLACAS TESTE

Dadas as características do agente tóxico e seu comportamento sobre a viabilidade, observou-se que a margem de segurança dessa substância é muito reduzida, havendo a necessidade de se redesenhar o protocolo de desafio para concentrações mais estáveis para otimizar o manejo em laboratório. Ao analisar as médias observou-se que, entre 5,0 mg/mL e 7,5 mg/mL de solução de AS, as viabilidades foram muito equivalentes e esses valores se aproximaram da CL 50. Para fins práticos, adotou-se o valor médio entre 7,5 e 5,0 mg/mL de AS e a CL 50 foi ajustada para 6,0 mg/mL. Ainda, seguindo este raciocínio, adicionou-se a este protocolo as concentrações de 3,0 mg/mL (valor aproximado da CL 25 do AS), e 1,5 mg/mL (valor aproximado da CL 10 do AS), assumindo-se o padrão linear da relação concentração efeito, conforme observado nos dois ensaios piloto.

Assim, o experimento principal foi delineado utilizando 3 diferentes concentrações de AS como agente intoxicante: 6,0 mg/mL, 3,0 mg/mL e 1,5 mg/mL, distribuídas em placas de 96 poços, sendo 12 repetições por cada fileira de poços. Para se evitar a contaminação acidental entre os controles água e água sucussionada, foi deixada uma fileira vazia de poços entre ambas, em cada placa. Tal cuidado foi fundamental para garantir a identificação de eventuais efeitos relacionados à sucussão do líquido *per se*.

A fase de experimento *in vivo* foi desenvolvida ao longo de duas semanas, de forma as fases da Lua serem observadas e consideradas na avaliação dos resultados^{160,175}, a fim de se evitar a intercorrência desta importante variável de confusão para modelos envolvendo animais marinhos. As fases crescente e cheia corresponderam ao período de testes e ainda, o período da Lua cheia coexistiu com o fenômeno da “superlua”, conforme calendário astronômico para a Cidade de São Paulo em 19 de fevereiro de 2019. A “superlua” é o evento circular em que a Lua está muito próxima da terra (363.000 quilômetros em média), em contraposição ao período de maior distância já registrado (405.500 quilômetros). A ação gravitacional do sol e outros planetas sobre a Lua podem modificar a sua trajetória elíptica ao redor da Terra, permitindo mudanças nessas distâncias¹⁷⁶. Uma suspensão contendo 200 mL de água marinha artificial, 0,075g de cistos e 5 mL de alimento foi preparada diariamente e utilizada no preenchimento dos poços, perfazendo um volume total de 200 µL por poço. Tal suspensão de cistos permite a inserção de oito cistos por poço em média. Os tratamentos foram inseridos em volume igual a 5% do volume total de cada poço. Todas as placas foram identificadas por número, série, data da preparação e fase da Lua. Devido à organização logística do experimento, foram preparadas seis placas na Lua crescente (dois dias seguidos, três desafios) e nove placas na Lua cheia (três dias seguidos, três desafios), conforme Tabela 6.

Tabela 6. Placas elaboradas na primeira e segunda semana do experimento e fases da Lua correspondentes

Lua crescente		
DIA 1 (13/02/2019)	DIA 2 (14/02/2019)	
Placa 1 (série 1 – 6,0 mg As)	Placa 2 (série 1 – 6,0 mg As)	
Placa 1 (série 2 – 3,0 mg As)	Placa 2 (série 2 – 3,0 mg As)	
Placa 1 (série 3 – 1,5 mg As)	Placa 2 (série 3 – 1,5 mg As)	

Lua cheia		
DIA 1 (18/02/2019)	DIA 2 (19/02/2019)	DIA 3 (20/02/2019)
Super lua		
Placa 3 (série 1 – 6,0 mg As)	Placa 4 (série 1 – 6,0 mg As)	Placa 5 (série 1 – 6,0 mg As)
Placa 3 (série 2 – 3,0 mg As)	Placa 4 (série 2 – 3,0 mg As)	Placa 5 (série 2 – 3,0 mg As)
Placa 3 (série 3 – 1,5 mg As)	Placa 4 (série 3 – 1,5 mg As)	Placa 5 (série 3 – 1,5 mg As)

4.4.1.4 ANÁLISE DAS PLACAS

As placas de 96 poços, já montadas, foram armazenadas num “berçário” (gaiola de Faraday artesanal) sob luz constante (24 lâmpadas de led, YITENG, YT666, 50-60 Hz) e temperatura ($23,7\pm 0,547^{\circ}\text{C}$) e fluxo magnético ($0,03\pm 0,060\mu\text{T}$) controlados. As placas permaneceram abertas para permitir o máximo de oxigenação necessária para a eclosão. A análise dos poços foi realizada no período de 24 e 48 horas após a elaboração de cada placa, sendo as análises de eclosão e viabilidade em 24 horas e de mobilidade em 48 horas.

Cada poço foi observado com lupa digital (Microscópio Digital C/ Zoom 1000x R Câmera 2.0 Mega Pixels USB 6 Leds, China) conectada a um computador (Yoga520, Lenovo®, Brasil) para captura de imagens (Software AMCAP) e contagem de cistos, náuplios vivos, náuplios mortos e náuplios em estágio guarda-chuva (recém eclodidos). Nos poços onde havia presença de náuplios vivos, foram realizados vídeos de 13 segundos para cada poço, para análise comportamental posterior. Esse tempo de filmagem foi padronizado previamente^{160,165}, visto que na literatura esse dado é muito variável^{177,178,179}. O uso de sistemas de vídeo permite ampliar os estudos observacionais dos organismos vivos, sobretudo dos animais marinhos¹⁷⁷. É um método prático por possibilitar armazenar e reanalisar as imagens capturadas a qualquer tempo. A maior parte das câmeras de vídeo trabalham em frequência padrão (30 quadros por segundo)^{178,179} e o software utilizado permitiu analisar a mobilidade média de cada poço, quadro a quadro.

Ao final do experimento, as placas foram congeladas (total de 15 placas) com o objetivo de avaliar os parâmetros físico-químicos da água, como interação com corantes solvatocrômicos pelo método de Cartwright, dosagem de arsênio por espectrofotometria de emissão atômica por plasma, e microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) para identificar a presença de arsênio metálico precipitado em micropartículas e arsênio solúvel.

4.4.1.5 PARÂMETROS ANALISADOS PARA DEFINIÇÃO DA TAXA DE ECLOSÃO E VIABILIDADE DOS NÁUPLIOS

Para o tratamento estatístico da eclosão de cistos, foram padronizados os seguintes parâmetros:

- Número de náuplios nascidos considerando-se todos os estágios presentes em 24 horas (vivos, mortos e guarda-chuva) por poço;
- Número de cistos não eclodidos por poço;
- A somatória de náuplios em cada uma das condições acima nos 12 poços de cada placa foi registrada como unidade experimental;
- Uma média de 550 náuplios foram analisados na Lua crescente por tratamento e 850 náuplios na Lua cheia, por tratamento;
- 3 concentrações de arsênio foram testadas para cada fase da Lua identificada no período experimental;
- N total = 15 placas (englobando todas as concentrações de arsênio): 8.951 cistos (período de 24 horas), discriminados nas Tabelas 7 e 8;
- Somatória de cerca de 10.000 náuplios considerando as 15 placas.

Tabela 7. Número de cistos (N) por placa, observados em período de 24 horas – Lua crescente

Lua crescente: N total = 2.908 cistos			
DIA 1 (13/02/2019)	Nº cistos (N)	DIA 2 (14/02/2019)	Nº cistos (N)
Placa 1(série 1 – 6,0 mg As)	267	Placa 2 (série 1 – 6,0 mg As)	328
Placa 1 (série 2 – 3,0 mg As)	553	Placa 2 (série 2 – 3,0 mg As)	441
Placa 1 (série 3 – 1,5 mg As)	671	Placa 2 (série 3 – 1,5 mg As)	648

Tabela 8. Número de cistos (N) por placa, observados em período de 24 horas – Lua cheia

Lua cheia: N total = 6.043 cistos					
DIA 1 (18/02/2019)	Nº cistos (N)	DIA 2 (19/02/2019)	Nº cistos (N)	DIA 3 (20/02/2019)	Nº cistos (N)
Super lua					
Placa 3 (série 1 – 6,0 mg As)	396	Placa 4 (série 1 – 6,0 mg As)	511	Placa 5 (série 1 – 6,0 mg As)	424
Placa 3 (série 2 – 3,0 mg As)	680	Placa 4 (série 2 – 3,0 mg As)	799	Placa 5 (série 2 – 3,0 mg As)	603
Placa 3 (série 3 – 1,5 mg As)	876	Placa 4 (série 3 – 1,5 mg As)	831	Placa 5 (série 3 – 1,5 mg As)	923

4.4.2 ANÁLISE DA MOBILIDADE DOS NÁUPLIOS

As análises dos poços foram feitas individualmente, com lupa digital (Microscopio Digital com Zoom 1000x R Câmera 2.0 Mega Pixels USB 6 Leds, China) conectada a um computador para captura de imagens e contagem de cistos e náuplios vivos e mortos. Esse parâmetro foi avaliado após análise estatística da eclosão e viabilidade, o que implicou na escolha das placas e na seleção da fase da Lua mais representativas para essa análise. Dado que o período de 48 horas refletiu melhor a vitalidade dos náuplios sobreviventes aos desafios, esse tempo foi selecionado para a análise da mobilidade, considerando apenas o período da Lua crescente.

Os vídeos foram registrados em formato AVI no software Image J – *plugin Trackmate*, contemplando o número de paradas e a locomoção dos náuplios, nas placas 1 e 2 (série 1 – 6,0 mg/mL, série 2 – 3,0 mg/mL, série 3 – 1,5 mg/mL). No total foram analisados 149 vídeos.

O programa foi ajustado para leitura de cores RGB. Utilizou-se como referência para identificação dos pontos de mobilidade a coloração amarela dos náuplios. Todas as imagens foram transformadas para resolução binária de 8 bits e o método de análise escolhido foi o *Phansalkar*. Após a análise pelo *Plugin Trackmate*, os dados gerados na planilha *Track Statistics* foram copiados e

transferidos para o Excel® e desta forma se obteve a média de *Track Stop* e *Track Displacement* de todos os quadros do vídeo para cada poço. Esses parâmetros traduzem o número de paradas dos náuplios e a movimentação dos náuplios, respectivamente.

4.4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

4.4.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS): MEV-EDS

Em função dos resultados obtidos na eclosão, para esta fase foram selecionadas duas placas com concentração de 6,0 mg/mL de AS cada, observadas na Lua crescente e cheia e que melhor representavam a média dos experimentos.

As placas escolhidas foram descongeladas. A seguir, o conteúdo de cada tratamento foi agrupado em três *pools*, previamente identificados, onde cada *pool* continha o material de 4 poços. Dessa forma, cada tratamento foi avaliado em triplicata. Os microtubos foram centrifugados (3300g, Centrífuga MCA mod. 1 – 4K, Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) a 3000 rpm por 3 minutos para separação do sedimento biológico e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore® de malha de 0.22 micrômetros. No dia seguinte, os sobrenadantes filtrados foram centrifugados a 10.000 rpm por 60 minutos, para sedimentação das micropartículas em suspensão.

Foram retirados 5 µL do sedimento de cada tubo e transferidos, em triplicata, para lamínulas previamente metalizadas (Figura 25) em câmara de vácuo (Desk V, Denton Vacuum, Corporate Headquarters Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) devidamente identificadas. As lamínulas foram, então, colocadas em estufa a 50°C até que as gotas secassem por completo.

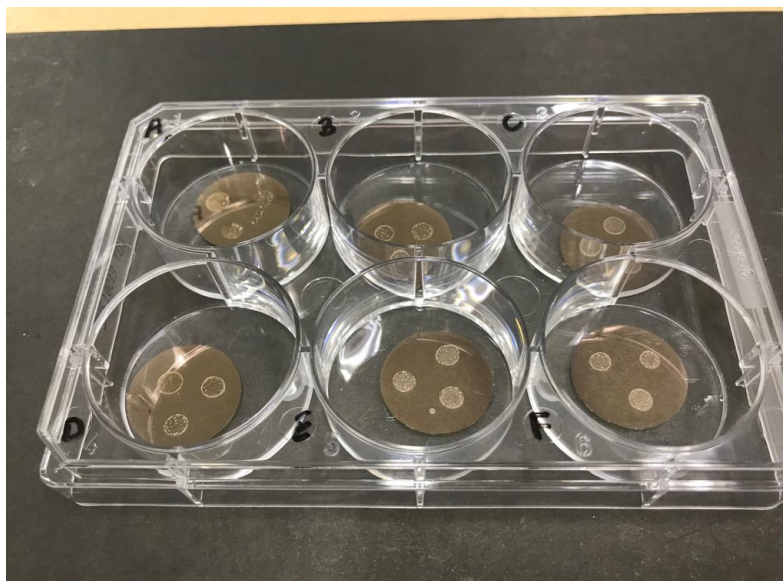


Figura 25. Placa de 6 poços com lamínulas metalizadas e os respectivos sedimentos, em triplicata, para análise em MEV-EDS

Imagem cedida por Andréia AG Pinto.

As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JSM 6510, JEOL, Tokyo, JAPAN) em aumento de 20 vezes e a área de cada gotícula foi capturada e examinada no sistema EDS para identificação dos elementos químicos presentes no sedimento depositado (Figura 26). Toda a área da gotícula foi delimitada por um quadrado de 3 mm x 5 mm, feito pelo próprio EDS, para padronização. Excluiu-se ouro (Au) e o silício (Si) das análises pelo EDS pois esses materiais são parte do substrato da amostra (o ouro é usado na metalização das lamínulas e o silício é o elemento químico principal na composição das lamínulas).

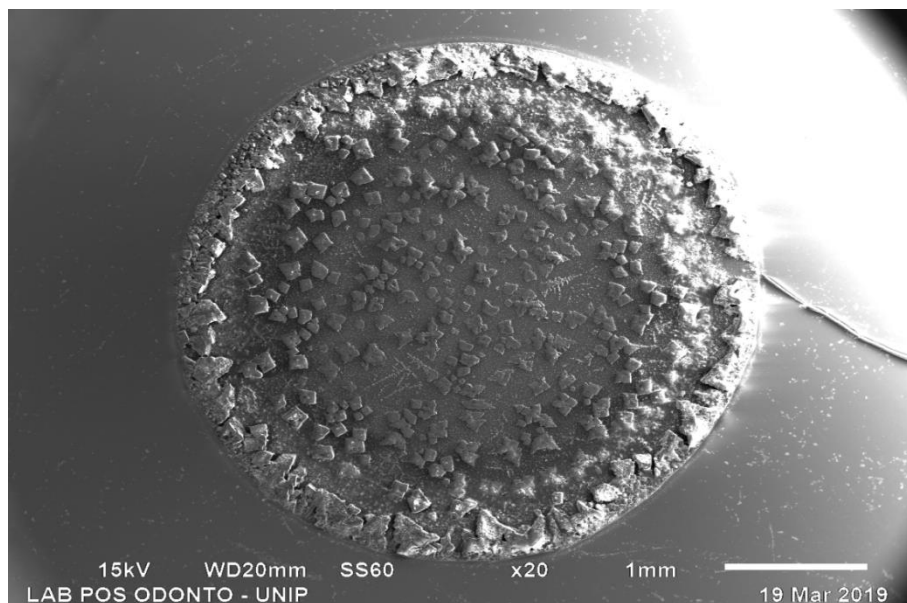


Figura 26. Imagem gerada em MEV de sedimento produzido a partir de amostra de água tratada com *Arsenicum 6* cH. Imagem ampliada 20 vezes e depositada sobre lamínula metalizada

Os dados da imagem e a porcentagem de átomos de cada gotícula foram salvos em CDs e as lamínulas armazenadas para eventuais análises futuras.

4.4.3.2 ANÁLISE DO ARSÊNIO SOLÚVEL NA ÁGUA

A análise foi encaminhada para laboratório terceirizado especializado (TASQA serviços analíticos Ltda, São Paulo – SP), para quantificação de arsênio pela técnica de espectrometria de emissão atômica em plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP/OES). Esta técnica permite um limite de quantificação do metal de 5,0 µg/L, numa faixa de trabalho entre 5,0 a 5000 µg/L.

A seleção das amostras para quantificação de arsênio solúvel foi feita a partir dos dados obtidos através do EDS da água, que identificou presença do arsênio nas amostras desafiadas com a concentração de 6,0 mg/mL de arseniato de sódio em ambas as fases lunares estudadas. Para esta etapa foi descongelado o restante da água utilizada no MEV-EDS, referentes às luas crescente e cheia, contendo 6,0 mg/mL de AS. As amostras de cada tratamento

foram unificadas em um único *pool*, diluídas em água purificada na proporção 1:100 e transportadas para o laboratório sob temperatura <10°C.

4.4.3.3 ESPECTROFOTOMETRIA COM CORANTES SOLVATOCRÔMICOS.

Por meio do método desenvolvido por Steven Cartwright⁹², conforme descrito na introdução, fez-se a avaliação das amostras de água e dos medicamentos homeopáticos pela interação com corantes solvatocrômicos.

Nesta etapa foram analisadas 3 placas da Lua crescente e 3 da Lua cheia, contendo AS nas concentrações de 1,5 mg/mL, 3,0 mg/mL e 6,0 mg/mL. Os microtubos que continham água utilizada na dosagem do AS solúvel (1,5 e 6,0 mg/mL de AS) foram descongelados e usados no preparo das amostras. Em tempo, foram descongeladas duas placas contendo 3,0 mg/mL de AS, nas respectivas fases lunares. No total foram utilizadas 6 placas, cada uma contemplando 7 tratamentos, perfazendo um total de 42 amostras. À parte, incluiu-se amostras das três potências de isoterápicos e dos três controles, resultando em um total de 48 amostras para análise.

Para análise da água, cada amostra consistiu em *pool* referente aos poços que ocupavam a mesma fileira. Durante o preparo, o conteúdo de cada poço (*pool*) foi acondicionado em um único microtubo e centrifugado por uma hora a 10.000 RPM (11,068g). A seguir, 100 µL de cada amostra foi adicionada a 9,9 mL de água purificada estéril sendo submetidas à sucussão em braço mecânico (Denise - Autic, São Paulo, Brasil), com a finalidade de manter o padrão das análises em soluções ultradiluídas submetidas à sucussão. Assim, as matrizes dos medicamentos foram novamente diluídas e dinamizadas, para se obter as potências 6 cH, 30 cH e 200 cH, além dos controles. Todas as amostras foram filtradas antes da sucussão, utilizando filtro de malha de 0,22 micrômetros e, em seguida, “cegadas” com o auxílio de um funcionário do centro de pesquisa não participante do experimento, trocando as etiquetas dos frascos por códigos.

Para cada corante foram preparadas amostras em triplicata, perfazendo um total de 144 análises. Os corantes foram preparados no dia anterior ao experimento, utilizando álcool absoluto como solvente, de acordo com o peso molecular e a molaridade de cada corante (Tabela 9). Em cada cubeta 25 µL da

amostra eram adicionados a 1475 μL do corante previamente filtrado e protegido da luz.

Antes das análises das amostras, feitas em série, o pico de absorvância de cada corante foi determinado pela varredura do corante puro por todo o espectro de luz visível, utilizando espectrofotômetro UV-VS (FEMTO, São Paulo, Brasil), após o estabelecimento da linha base utilizando apenas o álcool em uma cubeta.

Tabela 9. Corantes utilizados para a análise de espectrofotometria pelo método Cartwright

Corante	Cor em álcool puro	Molaridade μM	Peso Molecular g/mol	Conc. Mol(g) 250 ml de álcool	Comp. onda álcool puro nm	Absorbância (pico)
BDN (+) 4-(BIS- (Dimetilamino) fenil-Metileno)- 1(4H)-naftalenona	Roxo/azul	80	394,5	0,0079	501	0,686
Violeta metileno (+) (MV)	Púrpura	50	256,32	0,0033	591	0,587
ET 33 2,6-Dicloro-4- (trifenilpiridinium- 1-IL)-fenolato	Laranja	245	468,3	0,02878	469	0,294
N,N-Dimetil- indo- Anilina	Azul	25	226,27	0,0014	608	0,344
Vermelho do Nilo	Pink	20	318,37	0,0016	552	0,554
Cumarina 7	Verde fluorescente	25	333,38	0,0021	434 nm	0,605

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os programas IBM SPSS, versão 21.0 e GraphPad Prism, versão 6.0, para Windows™. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e avaliada por inspeção de parcelas quartil-quartil (gráficos Q-Q). A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene e a correção de Welch foi aplicada à ANOVA nos casos de não homogeneidade. Os *outliers* foram avaliados pela inspeção de plotagem Q-Q e removidos, se necessário.

O eta ao quadrado parcial (η^2), uma medida do tamanho do efeito, também foi relatado. Este parâmetro é particularmente útil para variáveis que apresentam grandes valores de desvio e análises de valor de p que podem levar a erros do tipo I (rejeição de uma hipótese falsa positiva) ou erros do tipo II (rejeição de uma hipótese falsa negativa).

Foi utilizada ANOVA de duas vias, com modelos mistos, para avaliação da interação estatística entre desafio e tratamento. Os resultados da reatividade das amostras com corantes solvatocrômicos foram analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As figuras foram feitas usando o software Prism 8.0.

5 RESULTADOS

5.1. ANÁLISES DAS PLACAS DE 96 POÇOS

Os medicamentos tiveram seus códigos revelados no início da análise estatística. Três fatores foram considerados na análise de variância de modelos mistos: desafio com arseniato de sódio (6,0 mg/mL, 3,0 mg/mL e 1,5 mg/mL), tratamento (*Arsenicum* 6 cH, 30 cH, 200 cH e controles) e fase da Lua (crescente e cheia / “superlua”). Em todos os casos, os parâmetros: número de náuplios vivos, mortos, cistos e formato guarda-chuva foram comparados.

Numa análise preliminar, houve comportamento concentração-dependente do desafio apenas nas amostras analisadas na Lua crescente, mas não na Lua cheia (no caso, “superlua”) (Gráficos 1 e 2).

5.2. ANÁLISE DA ECLOSÃO DOS CISTOS EM FUNÇÃO DAS FASES DA LUA E DOS TRATAMENTOS

A taxa de eclosão relativa foi definida como a soma dos cistos eclodidos de cada grupo dividida pela média dos cistos eclodidos no grupo não desafiado (*unchallenged*) após 24 horas do cultivo dos cistos. Em suma, o percentual de eclosão foi calculado somando-se o número de náuplios vivos, náuplios mortos e náuplios guarda-chuva de cada grupo, dividido pela média de náuplios vivos, mortos e guarda-chuva do grupo não desafiado.

$$\text{Taxa de eclosão (\%)} = \frac{(GC+NV+NM)_{\text{grupo: eclodidos}}}{\text{média}(GC+NV+NM)_{\text{unchallenged}}}$$

A média do grupo não desafiado foi usada como fator normalizador dos dados, pois mimetiza o ciclo da *Artemia salina* na natureza e sua variação natural de eclosão de acordo com as fases da Lua.

A eclosão relativa mostrou interação estatística entre desafio e Lua (Gráficos 1 e 2).

Observou-se que na Lua crescente o desafio de 6,0 mg/mL provocou maior taxa de eclosão em relação aos desafios de 1,5 e 3,0 mg/mL, com significância estatística (Gráfico 1). Portanto, ficou claro o efeito de dependência da concentração: quanto maior a concentração do agente intoxicante, maior a taxa de eclosão, independente do tratamento aplicado.

Este fato demonstra que o desenho experimental escolhido para o estudo foi adequado, pois foi capaz de produzir efeito tóxico na medida em que se aumentou a concentração de arseniato de sódio na água. Os cistos são formas de resistência das *Artemias* aos ambientes hostis, mas a concentração de 6,0 mg/mL de AS se mostrou tóxica o suficiente para provocar danos na casca do cisto, forçando a eclosão. Contudo, os efeitos não foram iguais na Lua cheia (Gráfico 2).

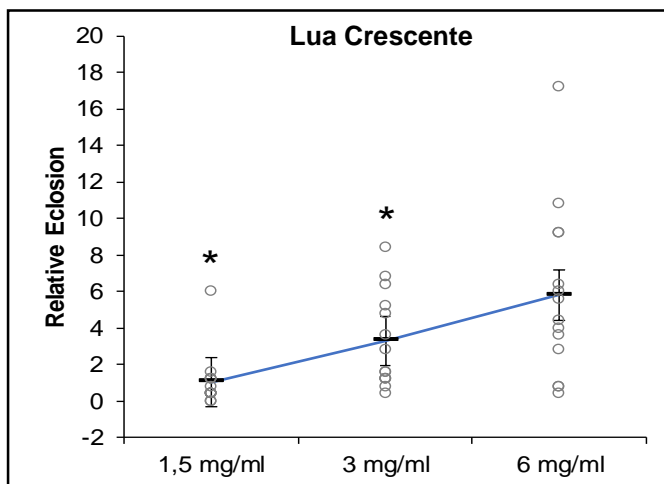


Gráfico 1. Efeito dos diferentes desafios com arseniato de sódio sobre a taxa de eclosão relativa na Lua crescente após 24 horas de cultivo. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Houve efeito significativo dos desafios sobre a taxa de eclosão na Lua crescente, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(2,21)} = 13,03$, $p=0,0002$, $\eta^2=0,553$). Foram encontradas diferenças entre a taxa de eclosão do grupo desafiado com 3 mg/mL e o desafiado com 1,5 mg/mL em relação ao desafiado com 6 mg/mL, segundo pós teste de Tukey (* $p<0,05$).

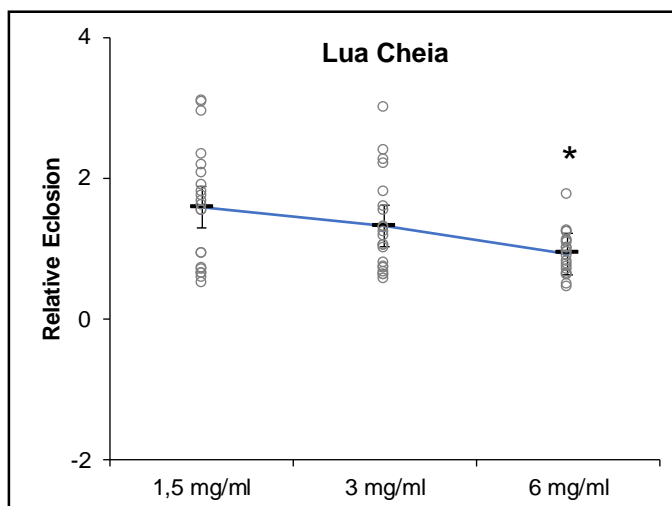


Gráfico 2. Efeito dos diferentes desafios com arseniato de sódio sobre a taxa de eclosão relativa na “superlua” após 24 horas de cultivo. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Houve efeito significativo dos desafios sobre a taxa de eclosão na Lua cheia, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(2,42)} = 4,99$, $p=0,011$; $\eta^2=0,192$). Foram encontradas diferenças entre a taxa de eclosão do grupo desafiado com 6 mg/mL em relação aos desafiados com 3 mg/mL e 1,5 mg/mL segundo pós teste de Tukey (* $p<0,05$).

O Gráfico 2, que corresponde aos dados obtidos na Lua cheia (“superlua”), mostra ausência de relação concentração-efeito da exposição dos cistos ao AS, com leve mas significativa diminuição na taxa de eclosão dos cistos no desafio com 6,0 mg/mL de AS. O desafio de 1,5 mg/mL foi o que demonstrou maior taxa de eclosão. Tal efeito contra-intuitivo foi atribuído hipoteticamente à ação gravitacional da “superlua” sobre a eclosão dos cistos, a qual teria mascarado os efeitos da intoxicação. Tal inferência foi possível dado o controle ambiental rigoroso do ambiente experimental durante as duas semanas de observação, envolvendo temperatura e fluxo magnético próximo ao cultivo das placas, conforme descrito em 4.4.1.4.

Portanto, os dados gerados no período da “superlua” foram descartados das análises dos efeitos dos tratamentos, a fim de se evitar vieses de interpretação. Assim, os dados obtidos no período da Lua crescente sobre a análise dos tratamentos revelaram uma curva, cujos efeitos foram bem evidentes (Gráfico 3).

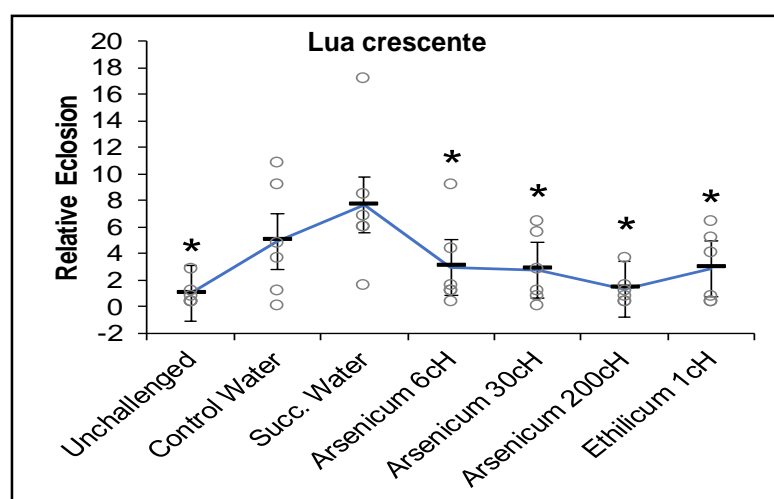


Gráfico 3. Efeito dos tratamentos na eclosão relativa dos cistos, considerando todas as placas analisadas e todos os desafios no período de Lua crescente. Observação feita após 24 horas de incubação. Os valores representam média ± intervalo de confiança de 95% para a média. Houve efeito significativo dos tratamentos, exceto da água sucussionada, sobre a taxa de eclosão, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(6,21)}=5,12$; $p=0,002$; $\eta^2=0,594$). Foram encontradas diferenças entre a taxa de eclosão dos grupos não desafiado (*unchallenged*), *Arsenicum 6 cH*, *Arsenicum 30 cH*, *Arsenicum 200 cH* e *Ethilicum 1 cH* em relação aos tratados com água sucussionada, segundo pós teste de Tukey (* $p<0,05$).

No Gráfico 3 observa-se diminuição estatisticamente significativa da taxa de eclosão nos grupos tratados com isoterápico de *Arsenicum* 6 cH, 30 cH, 200 cH e *Ethilicum* 1cH, quando comparada ao grupo não desafiado (*unchallenged*) na Lua crescente. Esse efeito só não foi observado no grupo da água sucussionada que, ao contrário, aumentou a taxa de eclosão em relação ao controle e, portanto, não mostrou proteção. Esse dado reforça a especificidade das preparações dinamizadas, pois a simples sucussão da água não surtiu o mesmo efeito. Os níveis de eclosão após o tratamento com *Arsenicum* 200 cH foram comparáveis ao grupo não desafiado (*unchallenged*).

A interação estatística entre desafio e tratamento pode ser vista no Gráfico 4.

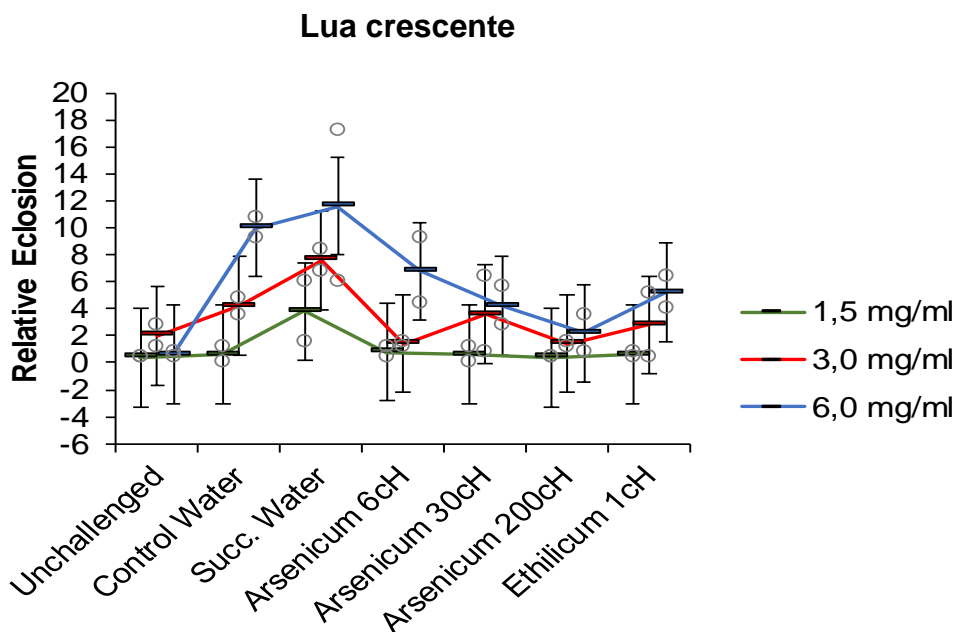


Gráfico 4. Efeito interação estatística entre os tratamentos e os desafios sobre a taxa de eclosão relativa na Lua crescente, período de 24 horas. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Não houve efeito significativo da interação entre os tratamentos e os desafios sobre a taxa de eclosão na Lua crescente, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(12, 21)} = 1,053$ $p = 0,441$ $\eta^2 = 0,375$).

Observa-se no Gráfico 4 que o grupo controle, ao ser desafiado com arsênio na concentração de 6,0 mg/mL, aumentou a taxa de eclosão 10 vezes mais que o grupo não desafiado (*unchallenged*). A comparação entre os desafios

mostrou efeito concentração-dependência. O pico da eclosão ocorre no grupo tratado com água sucussionada, a qual potencializou o efeito tóxico do arsênio. Não houve interação estatística entre desafio e tratamento, assim, pode-se dizer que o nível de desafio não altera o perfil de atividade dos tratamentos, cuja significância estatística é observada na somatória de todas as placas de cultivo, independentemente do desafio, conforme observado no Gráfico 3.

5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE: LUA CRESCENTE EM 24 HORAS

A taxa de sobrevivida foi definida como a razão de náuplios vivos divididos pela soma dos náuplios vivos e náuplios mortos e seu resultado representa a razão de náuplios vivos por placa.

A taxa de sobrevivida relativa é representada pela razão dos náuplios vivos por placa dividida pela média da razão do grupo *unchallenged* (não desafiado), para fins de normalização, conforme fórmulas descritas abaixo.

Taxa de sobrevivida relativa (%) = razão de náuplios vivos por placa / média da razão do *unchallenged*

onde:

NV/NV+NM = razão de náuplios vivos por placa

A interação estatística entre desafio e tratamento é vista no Gráfico 5.

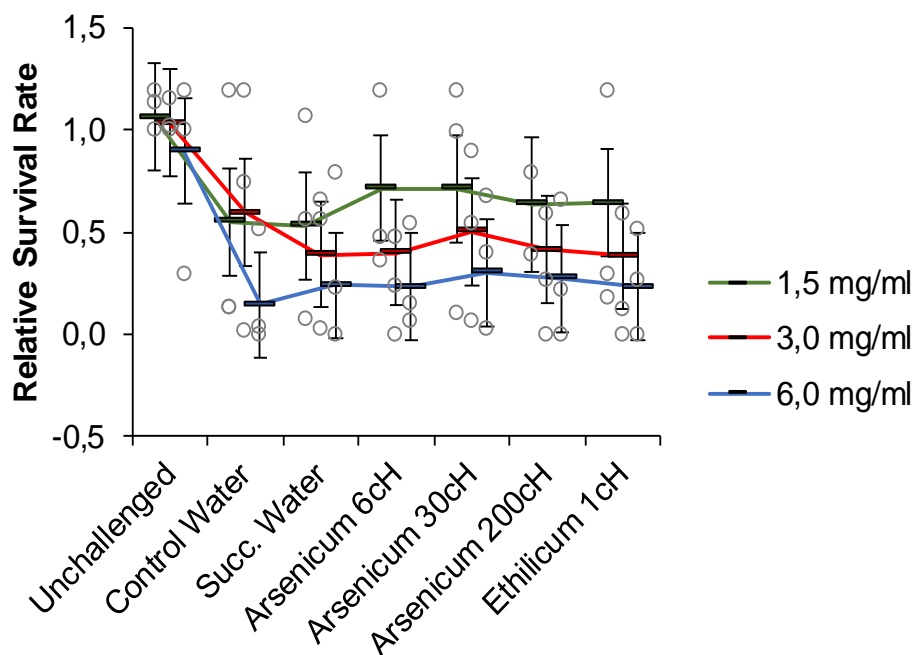


Gráfico 5. Efeito de interação estatística entre os tratamentos e os desafios sobre a taxa de sobrevivência relativa na Lua crescente, observado após 24 horas de incubação. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Não houve efeito significativo da interação entre os tratamentos e os desafios sobre a taxa de sobrevivência relativa, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(12, 62)} = 0,518$ $p=0,895$ $\eta^2=0,091$).

Os desafios não alteraram o perfil dos tratamentos e vice-versa. Fica evidente que no grupo *control water* (intoxicados e tratados com água apenas), a taxa de sobrevivência relativa está bem abaixo do grupo não desafiado (*unchallenged*), mostrando o efeito da intoxicação sobre a sobrevivência de maneira concentração-dependente. Os efeitos do tratamento sobre a sobrevivência, independente do desafio são mostrados no Gráfico 6.

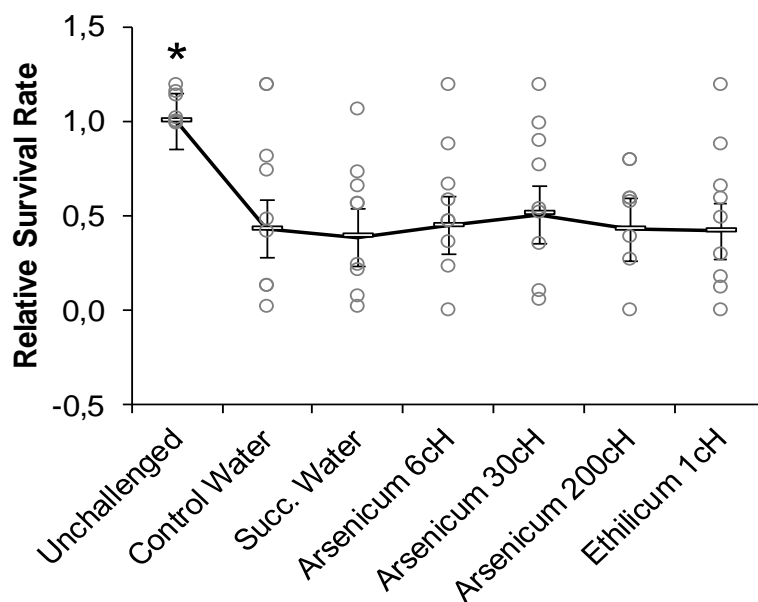


Gráfico 6. Efeito dos tratamentos sobre a taxa de sobrevivência relativa no período de Lua crescente, observado após 24 horas de incubação. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Não houve efeito significativo dos tratamentos, exceto do grupo não desafiado *unchallenged*, sobre a taxa de sobrevivência relativa, em relação aos demais grupos desafiados com AS. Segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(6, 62)}=7,414$ $p=0,000005$ $\eta^2=0,417$), foram encontradas diferenças entre a taxa de eclosão do grupo não desafiado (*unchallenged*), em relação aos demais grupos, segundo pós teste de Tukey (* $p<0,05$).

A taxa de sobrevivência foi maior no grupo não desafiado (*unchallenged*), como esperado, sendo este dado estatisticamente significativo. Em todos os tratamentos houve diminuição da sobrevivência e prevaleceu o efeito da intoxicação. Não houve interação estatística entre luas e tratamento relação à viabilidade (Gráfico 7).

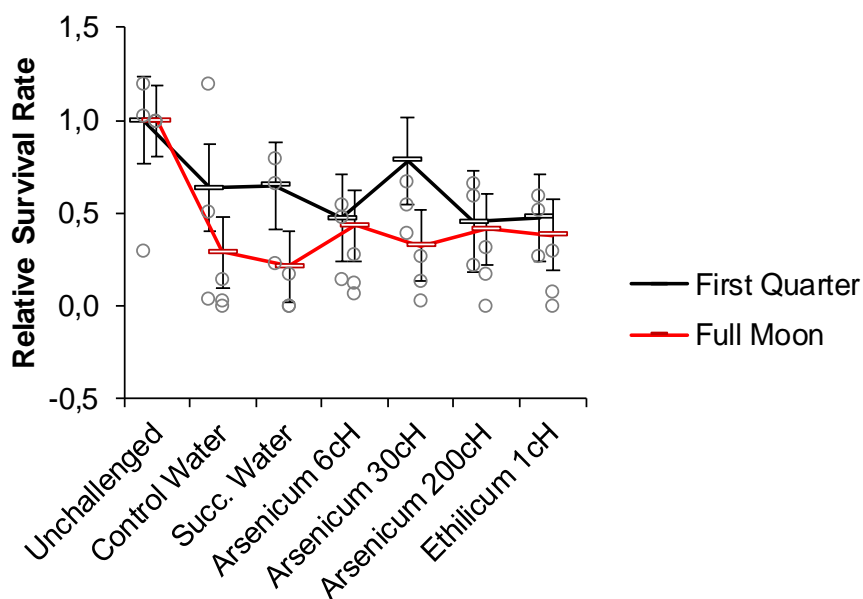


Gráfico 7. Efeito de interação estatística entre tratamentos e fase da Lua em relação à taxa de sobrevivência relativa; período de observação de 24 horas. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. Não houve efeito significativo da interação entre os tratamentos e as fases da Lua sobre a taxa de sobrevivência relativa, segundo ANOVA de dois fatores de modelos mistos ($F_{(6, 62)} = 1,64$ $p = 0,149$ $\eta^2 = 0,137$).

5.4 ANÁLISE DA MOBILIDADE: LUA CRESCENTE.

A análise da mobilidade dos náuplios nascidos após 48 horas do início da eclosão não mostrou diferenças entre tratamentos e desafios na Lua crescente (Gráficos 8 e 9).

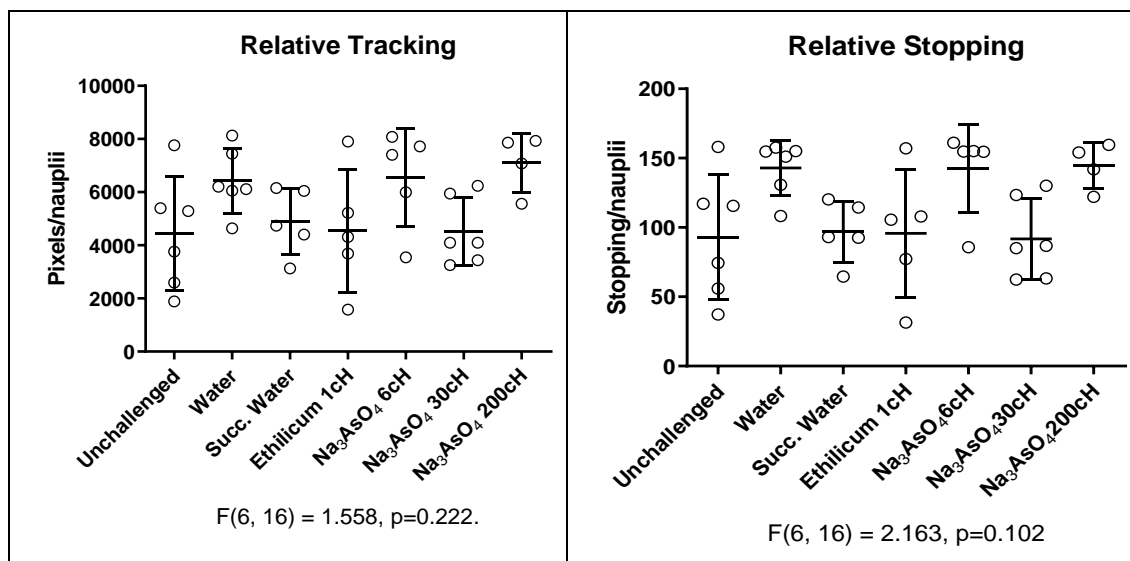


Gráfico 8. Mobilidade (*tracking*) e número de paradas relativas de náuplios após 48 horas de incubação, nos diferentes tratamentos, durante o período de Lua crescente. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. ANOVA de dois fatores de modelos mistos.

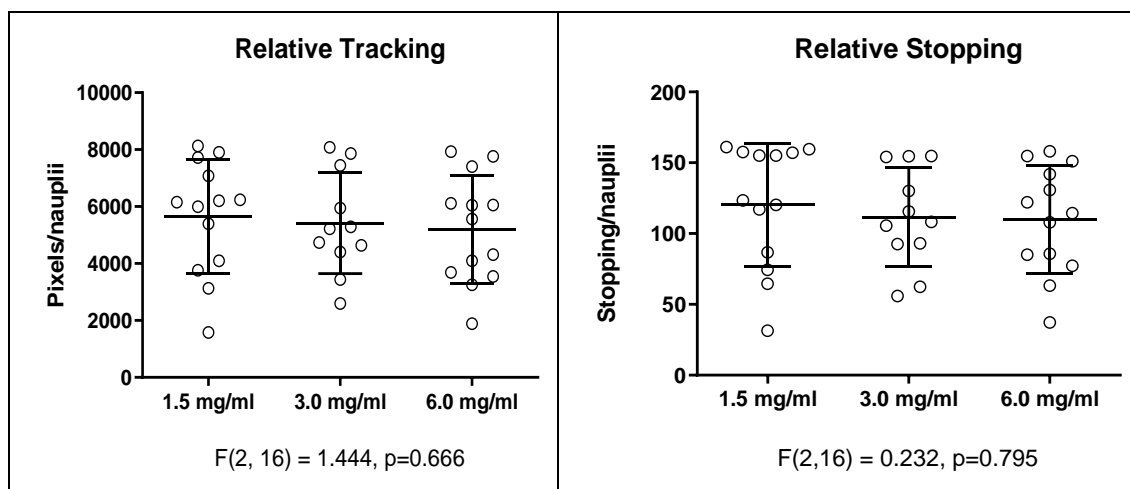


Gráfico 9. Mobilidade (*tracking*) e número de paradas relativas de náuplios após 48 horas de incubação, nos diferentes desafios, durante o período da Lua crescente. Os valores representam média \pm intervalo de confiança de 95% para a média. ANOVA de dois fatores de modelos mistos.

5.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DESCRITIVA DA ÁGUA POR MEV-EDS

Foi encontrado arsênio precipitado na água em quantidades mensuráveis apenas após o desafio com 6,0 mg/mL de AS, na Lua crescente, conforme mostrado na Tabela 10 e no Gráfico 10. O tratamento da água do mar com

Arsenicum 30 cH produziu aumento de quase 60% na precipitação de arsênio na água, comparando-se com as amostras tratadas apenas com água. Parte dessa precipitação foi identificada após o tratamento apenas com água (36,27%). Ao contrário, o tratamento com *Ethilicum* 1 cH produziu redução na precipitação de 50% em relação ao tratamento com água (Tabela 9), mas com grande variabilidade entre as amostras, o que não ocorreu com os isoterápicos de arseniato de sódio (Gráfico 10). Não foi encontrado arsênio precipitado na água no período da Lua cheia.

Tabela 10. Lua crescente: percentual médio de átomos de arsênio precipitado no sedimento colhido de *pool* de amostras de água do mar desafiadas com AS na concentração de 6,0 mg/mL, submetidas a diferentes tratamentos. Análises e resultados em % a partir do EDS.

TRATAMENTO	PERCENTUAL MÉDIO DE ÁTOMOS DE ARSÊNIO POR POOL DE AMOSTRA (%)	VARIAÇÃO EM RELAÇÃO AO CONTROLE ÁGUA
Não desafiado	0,12	-
Água (controle)	9,98	-
Água sucussionada	13,60	36,27%
<i>Arsenicum</i> 6 cH	12,28	23,04%
<i>Arsenicum</i> 30 cH	15,76	57,91%
<i>Arsenicum</i> 200 cH	9,10	-8,81%
<i>Ethilicum</i> 1 cH	4,96	-50,30

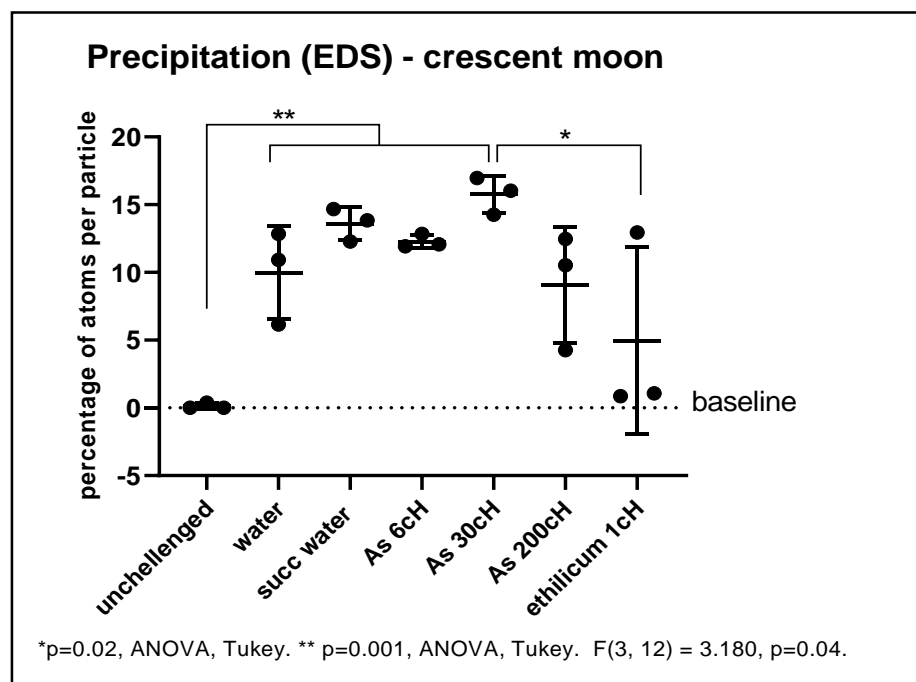


Gráfico 10. Percentual médio de átomos de arsênio por pool de amostra, identificado por EDS, após desafio com 6,0 mg/mL de AS no período da Lua crescente. As análises foram processadas em triplicata. Os valores representam média \pm desvio padrão e dados individuais de cada amostra. ANOVA, Tukey, com interação estatística ($F_{(3;12)} = 3,180$, $p=0,04$). Tukey, * $p=0,02$ entre grupo tratado com *Arsenicum* 30 cH e grupo tratado com *Ethilicum* 1 cH; ** $p=0,001$ entre grupo não desafiado e demais grupos, exceto *Arsenicum* 200 cH e *Ethilicum* 1 cH.

Como esperado, apenas traços de arsênio foram identificados nas amostras não desafiadas. Em todos os grupos contaminados houve precipitação de arsênio. A deposição de arsênio no grupo tratado com *Arsenicum* 30 cH foi a maior entre os grupos e com significância estatística em relação ao *Ethilicum* 1 cH.

5.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO SOLÚVEL PELO MÉTODO ICP/OES

O arsênio solúvel na água é o que está biodisponível. Dosar a concentração do arsênio solúvel na água do mar permite checar se o modelo experimental proposto para este estudo está coerente, ou seja, produziu uma

real intoxicação nos grupos estudados. A seleção das amostras foi baseada nos dados obtidos nas análises feitas em EDS, ou seja: amostras desafiadas com 6,0 mg/mL de AS nas Luas crescente e cheia. A fração enviada para análise foi o próprio sobrenadante filtrado das amostras analisadas em MEV-EDS, para que os dados de ambas as análises fossem complementares entre si.

A Tabela 11 mostra os valores de arsênio (em mg/L) solúvel indicados pelo laboratório. Níveis mensuráveis de arsênio foram identificados apenas nas amostras desafiadas, como esperado.

A comparação das proporções entre arsênio solúvel e precipitado nos diferentes tratamentos é mostrada no Gráfico 11. Há uma inversão no grupo tratado com *Arsenicum* 30 cH, mostrando maior tendência à precipitação.

Variações relativas às fases da Lua também foram vistas: enquanto os níveis de arsênio solúveis permanecem relativamente estáveis entre os grupos tratados com diferentes potências de *Arsenicum* na Lua crescente, as mesmas amostras obtidas na Lua cheia mostram tendência à redução em função das potências dos isoterápicos e redução ainda maior no grupo *Ethilicum* 1 cH (Tabela 11, Gráfico 12). Por se tratar de análise descritiva, baseada em um *pool* de amostras, tais dados são preliminares e sugerem a plausibilidade de estudos sistemáticos no futuro, envolvendo métodos de quantificação mais precisos do arsênio, tanto solúvel quanto precipitado.

Tabela 11. Concentração de arsênio solúvel (mg/L) na água do mar determinado por ICP/OES, em função do tratamento e da fase da Lua

Desafio	GRUPO	LUA	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
6,0 mg/mL	Não desafiado	Cheia	0,077
	Água (controle)	Cheia	10,40
	Água sucussionada	Cheia	12,30
	<i>Arsenicum</i> 6 cH	Cheia	10,40
	<i>Arsenicum</i> 30 cH	Cheia	9,85
	<i>Arsenicum</i> 200 cH	Cheia	9,42
	<i>Ethilicum</i> 1 cH	Cheia	6,98
	Não desafiado	Crescente	0,045
	Água (controle)	Crescente	12,00
	Água sucussionada	Crescente	14,10
	<i>Arsenicum</i> 6 cH	Crescente	10,80
	<i>Arsenicum</i> 30 cH	Crescente	11,50
	<i>Arsenicum</i> 200 cH	Crescente	13,00
	<i>Ethilicum</i> 1 cH	Crescente	10,7

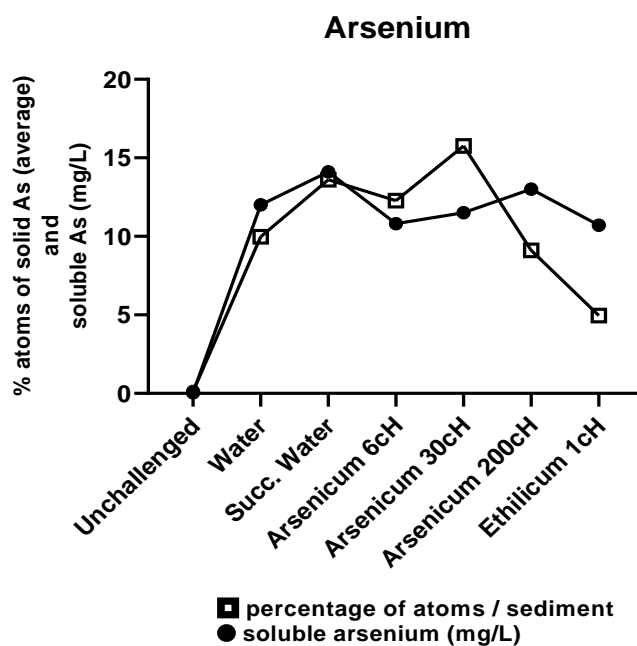


Gráfico 11. Arsênio precipitado na água (porcentagem média de átomos por sedimento, determinado por EDS) e concentração de arsênio solúvel (mg/L determinado por ICP/OES) em todos os grupos desafiados com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio na Lua crescente.

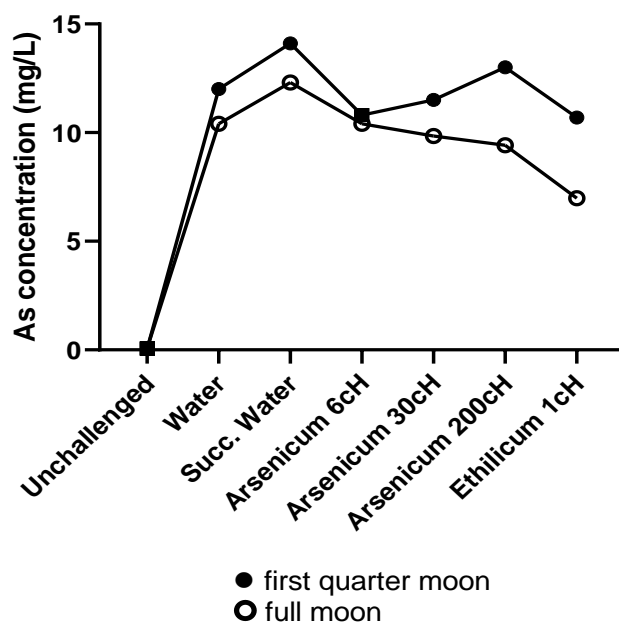


Gráfico 12. Concentração de arsênio solúvel (mg/L) determinado por ICP/OES, em todos os grupos desafiados com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio em função da fase da Lua.

5.7 ANÁLISE DE ESPECTROFOTOMETRIA PELO MÉTODO CARTWRIGHT

A análise dos medicamentos mostrou interatividade específica de diferentes potências homeopáticas para os corantes: Vermelho do Nilo, Cumarina e ET33, em relação aos controles (veículo, água e água sucussionada), conforme Gráfico 13.

A análise da água obtida das amostras desafiadas com arseniato de sódio 6,0 mg/mL, processadas na Lua crescente e tratadas com *Arsenicum* 6 cH mostrou interação com os corantes ET33 e Vermelho do Nilo (Gráfico 14).

Observa-se maior correspondência entre as amostras de *Arsenicum* 6 cH *in natura* e amostras de água do mar tratada com *Arsenicum* 6 cH nas variações de absorbância do Vermelho do Nilo (Gráficos 13 e 14).

Não houve reatividade entre água e corantes nas amostras correspondentes aos desafios de 3,0 mg/mL e 1,5 mg/mL da Lua crescente e em nenhuma amostra obtida no período da Lua cheia (dados não mostrados).

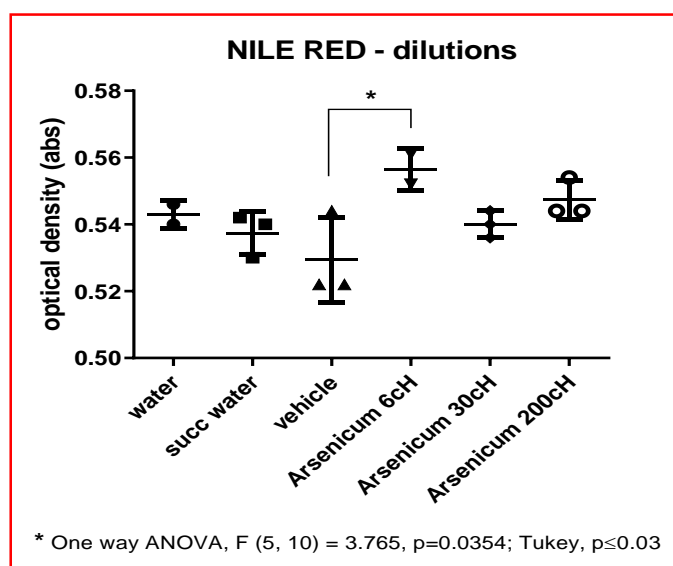
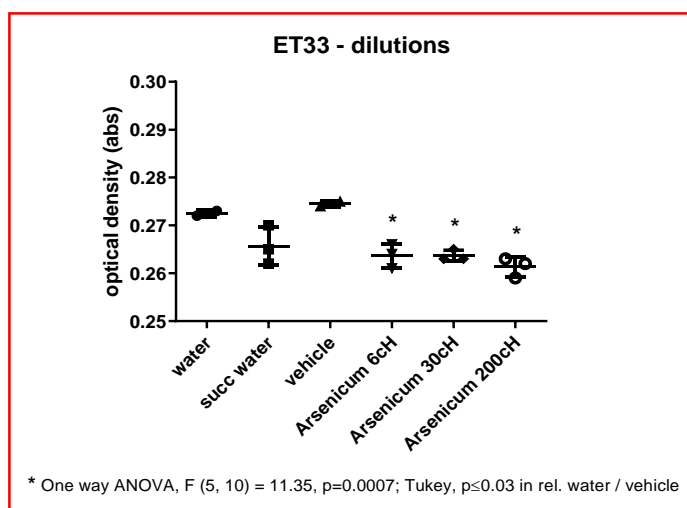
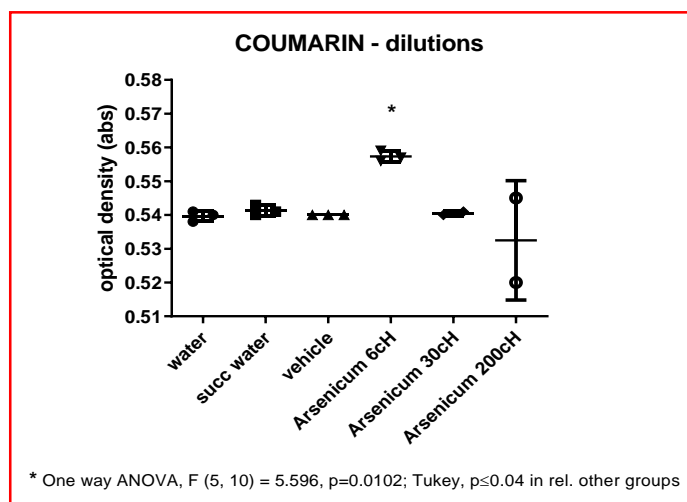


Gráfico 13. Variações de absorvância de corantes solvatocrômicos responsivos a diferentes potências de *Arsenicum*. Lua crescente, desafio com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio. Vehicle = *Ethilicum* 1cH.

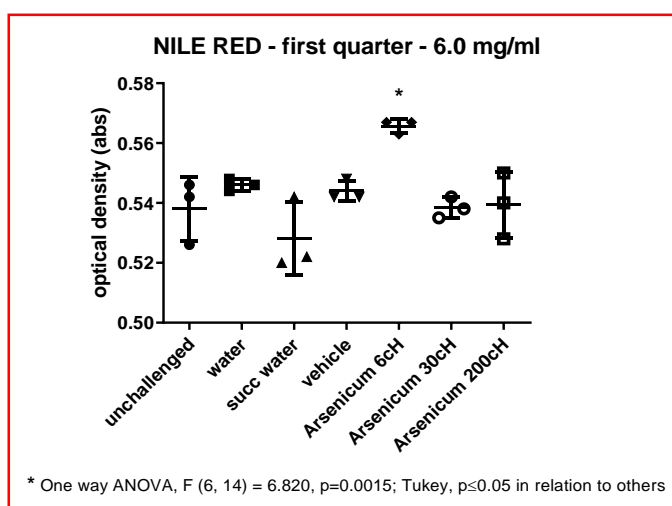
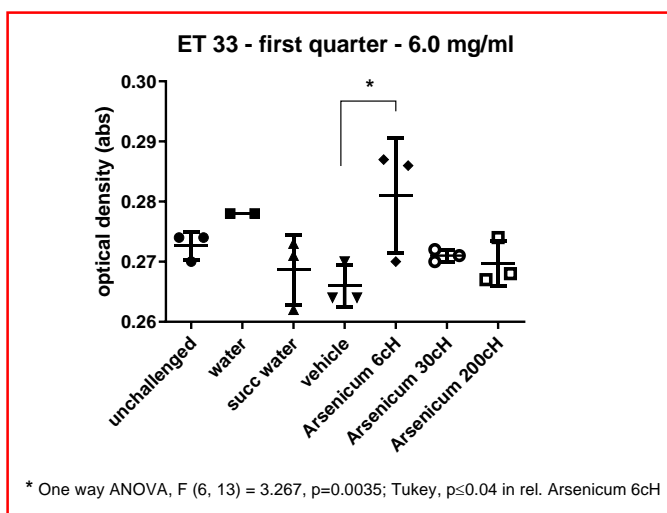
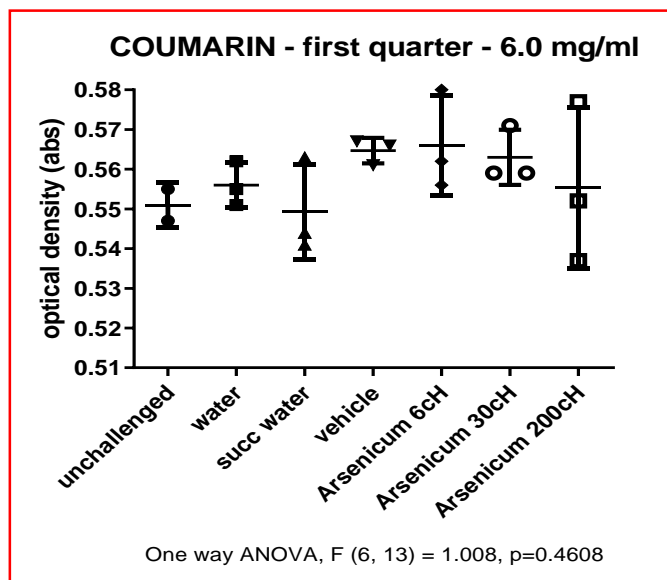


Gráfico 14. Variações de absorvância em corantes solvatocrômicos responsivos a amostras de água do mar tratadas com diferentes potências de *Arsenicum*. Lua crescente, desafio com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio. Vehicle = *Ethilicum* 1cH.

6. DISCUSSÃO

No protocolo inicial do nosso estudo constava a determinação da CL 10 de arseniato de sódio para a realização das demais fases da pesquisa. Porém, a curva de viabilidade dos náuplios expostos ao arseniato de sódio (AS) não apresentou linearidade suficiente para se estabelecer a CL10 com segurança: diluições crescentes mostravam viabilidade sempre maior que 90% e, de forma categórica, saltava para 50% após pequeno aumento da concentração do agente tóxico.

A partir desta observação, desenvolvemos nova metodologia para definição do limite de exposição dos cistos e náuplios, utilizando 2 placas de 96 poços e testando diferentes concentrações da solução de AS (a partir da solução estoque): 5,0 mg/mL, 6,0 mg/mL, 7,5 mg/mL e 9,0 mg/mL, cada poço com volume total de 200 µL. As placas foram lidas em 2 e 20 horas após a exposição, sendo constatado efeito tempo-dependente na viabilidade dos náuplios. Concluiu-se que, após 20 horas, as taxas de viabilidade entre as diferentes concentrações de AS testadas foram muito semelhantes (aproximadamente entre 40 e 60%) e, portanto, tais percentuais se aproximavam da CL 50. A partir dessas evidências, foi delineado um novo protocolo, trabalhando com três concentrações de arsênio: 6,0 mg/mL, 3,0 mg/mL e 1,5 mg/mL distribuídas em 3 placas de 96 poços, sendo realizadas leituras com 24 e 48 horas.

No estudo realizado por Gutu *et al.*, 2015¹⁸⁰, a avaliação comparativa da toxicidade a curto prazo (24, 48 e 72 h) de compostos de arsênio inorgânicos em *Artemia salina* mostrou efeito máximo do arseniato em 24 horas, mas apenas em concentrações acima de 200 µg/mL. No entanto, às 48 h de exposição, observou-se 100% de letalidade para 50 e 100 µg/mL e, após 72 horas de exposição, a letalidade máxima foi induzida pelas concentrações iniciadas em 50 µg/mL. Esses resultados estão de acordo com os obtidos nesta pesquisa, que evidenciou o aumento da letalidade dos náuplios para acima de 50% na medida em que se aumentaram as concentrações de arsênio, em função do tempo de exposição.

Bastos *et al.*, 2016¹⁸¹ estudaram a influência do ciclo lunar na reprodução e no tempo de incubação de ovos de *Macrobrachium amazonicum* e concluíram que o ciclo lunar tem efeito sobre o comportamento de camarões e influencia a

eclosão das larvas. Observaram que a taxa de desova foi maior na Lua minguante e que o tempo de incubação dos ovos de *M. amazonicum* e o número de larvas eclodidas foram melhores na Lua crescente.

Diante das evidências da importância das fases da Lua sobre o comportamento e desenvolvimento dos animais marinhos, separamos os dados obtidos ao longo das cinco séries de experimentos em função das fases da Lua para posterior análise estatística, considerando que esta poderia ser uma variável de confusão relevante para o desfecho da pesquisa. De fato, todos os parâmetros analisados mostraram diferenças importantes entre as semanas de Lua crescente e Lua cheia, sobretudo pelo fato da Lua cheia ter coincidido com o fenômeno chamado de "superlua". Destaque-se os efeitos sobre a toxicidade do arsênio, que produziu um efeito contra-intuitivo sobre a eclosão dos cistos, talvez por mascarar os efeitos tóxicos, dada a predominância dos efeitos da força da gravidade nesse período.

O termo "superlua" foi criado em 1979 pelo astrólogo americano Richard Noole, para representar a fase em que a Lua cheia está mais próxima da Terra^{176,182}. Na astronomia, este fenômeno é conhecido como "Lua cheia perigeana"¹⁸². Perigeu é o ponto da órbita da Lua que mais se aproxima da Terra, medindo em média 363.000 quilômetros, e apogeu o mais distante, podendo chegar a 405.500 quilômetros¹⁷⁶. A ação gravitacional do sol e outros planetas podem modificar a trajetória elíptica da Lua ao redor da Terra, permitindo mudanças nessas distâncias¹⁷⁶ (Figura 28).

A força gravitacional da Lua exerce influência direta sobre nosso planeta e, de acordo com suas fases, é capaz de movimentar grandes massas de água, influenciando diretamente no fenômeno das marés¹⁸². Na fase em que o sol e a Lua estão alinhados com a Terra, evento que acontece nas Luas cheia e nova, a somatória das forças das marés lunar e solar serão máximas e, com isso, o nível dos oceanos aumenta neste período¹⁸³. A "superlua", por estar mais próxima da Terra, acentua os eventos das marés ao exercer uma força maior sobre as águas do mar¹⁸². Esses efeitos também podem ser observados nos continentes, embora em menor grau, por meio de deformações visco-elásticas na crosta terrestre, fenômeno denominado "maré terrestre"¹⁸⁴. Também são descritos na literatura que a ação dessas forças no campo gravitacional terrestre pode provocar oscilações periódicas na atmosfera e modificar o clima, por

modularem parcialmente as correntes e até ocasionar modificações na temperatura superficial dos oceanos, durante marés extremas¹⁸⁵. Há registros que grandes eventos de *El Niño* aconteceram em função da posição da lua em seu ciclo¹⁸⁶.



Figura 27. Lua cheia normal x “superlua”: A Lua cheia quando coincide com o perigeu pode ter seu diâmetro e brilho aumentados em até 30%, comparadas a uma Lua cheia normal¹⁸². Fonte da imagem: Nasa/JPL-Caltech.

Braga *et al.* (2016) analisaram a influência da “superlua” nos deslocamentos de 4 estações da RBM (Rede Brasileira de Monitoramento contínuo dos Sistemas GNSS – Global Navigation Satellite System), devido às marés terrestres. Os dados obtidos durante trinta dias de observação foram processados sem incluir a correção das marés terrestres e, posteriormente, foram consideradas essa correção. Os resultados demonstraram que os maiores deslocamentos neste período foram observados no dia da “superlua”¹⁸⁷.

Os efeitos da “superlua” também são evidentes na agricultura, modificando o comportamento de várias plantas. Observa-se uma tendência dos frutos ficarem mais suculentos nesta fase, pois o desenvolvimento da copa das

plantas é favorecido. Por outro lado, a agricultura está também mais suscetível a pragas, pois a luminosidade maior atrai mais insetos^{188,189}.

A Lua cheia, simplesmente, já tem grande impacto sobre os animais, principalmente os marinhos. O ciclo da Lua pode interferir na disponibilidade do alimento, por atuar sobre as marés e correntes marítimas. Pesquisas indicam que muitos seres marinhos possuem relógios biológicos ajustados com as fases da Lua e esse fato pode modular seus padrões de comportamento¹⁸⁹.

Pinto (2020) estudou os efeitos do tratamento com isoterápicos em *Artemia salina* intoxicada com cloreto de mercúrio e correlacionou os resultados com as fases da Lua. Concluiu que nas Luas minguante e cheia a eclosão dos cistos foi mais precoce e que os efeitos dos tratamentos foram mais visíveis na Lua cheia. Essas evidências tornam clara a influência do ciclo da Lua na vida desses animais¹⁷⁵.

A *Artemia salina* é considerada um dos seres vivos mais adaptáveis da natureza. Na fase do cisto, exibe seu maior potencial de defesa contra as agressões do meio externo ao qual se encontra¹⁴⁰. Mecanismos protetores vão desde as camadas que envolvem os cistos, até as alterações metabólicas e genéticas que acontecem durante a diapausa^{140,141,142}. Em condições ambientais desfavoráveis, os cistos podem não eclodir, como uma forma de se proteger, exibindo toda sua plenitude na arte da sobrevivência¹⁴⁵.

Os resultados desta pesquisa nos permitiram concluir que a eclosão dos cistos foi concentração-dependente, sendo maior após o desafio com 6 mg/mL de AS, independentemente do tratamento, embora tal efeito tenha sido anulado na “superlua”, dirigindo a análise dos resultados para as amostras geradas na Lua crescente. Estudos mostram que cistos são formas de resistência das artêmias aos ambientes hostis^{140,141,145}, mas a concentração de 6,0 mg/mL de AS foi suficientemente tóxica, capaz de provocar eventuais danos na casca do cisto, forçando a eclosão. A análise dos efeitos dos tratamentos mostrou que a água sucussionada potencializou o aumento da taxa de eclosão induzida pela intoxicação, mas esse efeito foi revertido pelos tratamentos dinamizados (*Arsenicum* 6 cH, 30 cH, 200 cH e *Ethilicum* 1 cH). Ao contrário, houve redução significativa na taxa de eclosão entre os cistos tratados, em relação aos cistos que foram apenas desafiados. Curiosamente, os níveis de eclosão do grupo

tratado com *Arsenicum* 200 cH foram comparáveis ao grupo não desafiado com arseniato de sódio (*unchallenged*).

Em contrapartida, a viabilidade dos náuplios apresentou redução diretamente proporcional à concentração de AS. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos na ANOVA de modelos mistos. Na Lua crescente, náuplios tratados com isoterápico de arsênio na potência 30 cH mostraram leve tendência a aumentar a viabilidade, mas a grande variabilidade implicou em ausência de significância estatística. Interessante lembrar que amostras de água colhidas na Lua crescente e tratadas com *Arsenicum* 30 cH apresentaram maior precipitação de arsênio sólido em relação à concentração de arsênio solúvel, após o desafio com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio. Além da precipitação em si, eventuais mudanças no metabolismo do arsênio pelos náuplios poderiam ser consideradas, sobretudo no que diz respeito à produção de organoarsênicos, como a arsenobetaína³⁰, tendo em vista a redução progressiva e linear da concentração de arsênio solúvel na água em função da potência do *Arsenicum* utilizada (Gráfico 12). Pesquisas futuras podem ser promissoras nessa área, considerando que o arsênio é um dos venenos mais tóxicos e cuja remediação é sempre limitada.

Nenhum dos parâmetros relacionados à mobilidade de náuplios (*tracking* e *stopping*) mostraram mudanças significantes em relação aos desafios e aos tratamentos na Lua crescente, mostrando ser este um fator de baixa sensibilidade para o modelo proposto. A ação dos medicamentos homeopáticos foi evidente apenas nos processos concernentes à eclosão dos cistos, protegendo os náuplios do ambiente adverso ao qual estariam expostos após o nascimento, por prolongar a diapausa^{140,142,145}. Como a informação dos isoterápicos e do *Ethilicum* 1 cH modularia os processos de controle da eclosão ainda é um ponto de especulação.

Dois fatores inespecíficos poderiam ser descartados como possíveis explicações: a sucussão do líquido em si, com formação de nanobolhas e demais nanoestruturas, e a presença de álcool residual proveniente das matrizes medicamentosas. De acordo com Agarwal *et al.* (2011), nanobolhas possuem a capacidade de gerar radicais livres altamente reativos e catalisar diversas reações químicas quando submetidas à cavitação¹²¹.

No caso da sucussão, observa-se que a água sucussionada em si potencializou os efeitos tóxicos do arseniato de sódio; ao contrário, as demais preparações dinamizadas produziram efeito protetor. No caso do álcool residual, presente na proporção de 30% nas matrizes medicamentosas, há uma diluição inicial de 1:100 na preparação das diluições de trabalho feitas em água purificada e um fator de diluição adicional, tendo em vista que o tratamento correspondeu a 5% do volume total de água de cada poço. Ao final, a concentração de álcool por poço foi de 0.015% ou 15 ppm, nível muito baixo para produzir efeitos sobre os náuplios, uma vez que a concentração de 60% é necessária para a redução da sua atividade¹⁹⁰, o que também não ocorreu neste ensaio.

Na literatura vários trabalhos reforçam a validação de medicamentos ultradiluídos em homeopatia, incluindo o uso de isoterápicos, no tratamento das intoxicações por metais pesados. A eficácia do medicamento *Arsenicum album* 30 cH em *Escherichia coli* intoxicada com arsenito de sódio é mostrada em um ensaio em que se observa diminuição da toxicidade do arsênio, inibição da geração de radicais livres e menor dano ao DNA¹²⁴.

Belon *et al.* em 2007 realizaram um estudo duplo cego placebo-controlado utilizando *Arsenicum album* 30 cH em moradores de aldeias da Bengala Ocidental que ingeriam água e alimentos contaminados por arsênio. Observaram que no grupo de pacientes que receberam a medicação, comparado ao grupo placebo, houve melhora na função hepática e renal, redução da anemia e melhora de diversos parâmetros de imunidade, com incremento da saúde em geral, sendo tais dados comprovados por exames laboratoriais. Os autores apontam esse medicamento como possível indicação no tratamento da arsenicose, principalmente em áreas de alto risco, cuja prevenção à exposição está longe de ser uma realidade⁵⁸.

Ive *et al.*, 2012, realizaram estudo *in vitro* para testar a autorrecuperação de células com *Arsenicum album*, após terem sido expostas ao IC50 do As₂O₃ (trióxido de arsênio). Usaram uma linhagem celular (MT4) pré-intoxicada com (As₂O₃) tratada com potências homeopáticas de *Arsenicum album* 6 cH, 30 cH e 200 cH, com e sem sucussão. Com a finalidade de definir a dosagem correta de As₂O₃ para a indução do estresse celular, os autores testaram diferentes concentrações desse agente (1 µM, 5 µM e 10 µM), diferentes tempos de exposição (24 h e 48 h) e diferentes volumes (5 µL, 10 µL, 20 µL e 50 µL), a fim

de identificar a maior dose capaz de causar 50% da morte celular, em triplicata usando o ensaio MTT. A concentração ótima de As_2O_3 para permitir 50% da morte celular (IC50) foi estabelecida com a concentração de 5 μM (133 μL) ao longo de 48 h. O maior efeito terapêutico foi observado quando as células MT4 foram intoxicadas com 5 μM de As_2O_3 por 48 horas e, em seguida, tratadas por 72 h com *Arsenicum album* na potência 200 cH (medicamento succussionado)¹⁹².

Em suma, os dados apresentados no presente estudo abrem portas para possíveis aplicações práticas dos isoterápicos de arsênio ou de outras substâncias tóxicas como prováveis agentes remediadores de poluição ambiental, em especial da água. Os efeitos protetores dos tratamentos com diferentes potências do isoterápico sobre a *Artemia salina*, após a contaminação da água com 6,0 mg/mL de arseniato de sódio foram observados nos parâmetros eclosão de cistos e proporção entre arsênio solúvel e precipitado na água, neste último caso, um efeito observável apenas com a potência 30 cH. Os efeitos sobre a viabilidade foram mais sutis, sem significância estatística. Tais discrepâncias permitem supor que os embriões em diapausa sejam mais sensíveis aos estímulos dos isoterápicos do que os náuplios nascidos, uma vez que possuem mecanismos adaptativos mais refinados, os quais poderiam ser deflagrados sob o estímulo dos tratamentos.

O uso de insumos homeopáticos como remediadores ambientais vem sendo aplicado com sucesso há alguns anos. Santos (2016) avaliou a remediação de solos contaminados com chumbo e cádmio. Antes do cultivo das plantas, tratou o solo com diferentes potências do medicamento homeopático *Nux vomica* e observou como se desenvolviam as plantas de trigo e soja naqueles solos. Concluiu que o tratamento homeopático não interferiu na fitodisponibilidade dos metais nas plantas, mas ainda assim promoveu o crescimento, expressos pela diferença da altura e diâmetro do caule das plantas. Apesar da intoxicação, o medicamento homeopático conseguiu modular uma resposta adaptativa eficiente no organismo, o que pode ser caracterizado como bioremediação¹⁹³.

Betti *et al.* 2013 realizaram um estudo utilizando trióxido de arsênio (As_2O_3) nas concentrações de 150 e 200 μM e isoterápicos nas potências decimais 5 DH e 45 DH (sendo a água succussionada como controle), em um modelo de germinação de pólen *in vitro*. Grãos de pólen foram estressados com

doses sub-letais de As_2O_3 para reduzir a taxa de germinação e, em seguida, foram tratados com isoterápicos em baixa e alta diluição. Os resultados mostraram uma melhora significativa nas taxas de germinação em todos os grupos tratados, principalmente com a potência 45 DH, mas também com água succussionada, concluindo que o processo de dinamização é fundamental na determinação dos efeitos¹⁹⁴. Modelos experimentais com uso de plantas já são utilizados há alguns anos na pesquisa básica em homeopatia^{127,128}, por possibilitar a coleta de grande número de dados em curtos períodos e, ao mesmo tempo, estar livre do efeito placebo e de impedimentos éticos.

Uma ferramenta potencialmente importante para o monitoramento dos efeitos dos insumos homeopáticos em situações de campo é a solvatocromia. Tendo como base a propriedade dos corantes solvatocrômicos de evidenciar mudanças ocorridas no solvente nas soluções ultradiluídas e succussionadas, através de diferentes aspectos de absorvância, realizar a análise dos medicamentos e controles, bem como da água em que foram inseridos esses medicamentos, pode fortalecer (ou não) a hipótese da propagação ou manutenção de eventuais sinais físico-químicos desses medicamentos na água, mesmo em grandes volumes¹⁹⁸.

Teoricamente, a informação contida no medicamento é amplificada em sistemas biológicos e os corantes revelariam esse sinal, em consequência das alterações nas propriedades elétricas do solvente¹²⁹. Tal efeito representaria um “imprinting” ou “assinatura eletromagnética” para cada preparação dinamizada específica. Contudo, a descrição exata de quais características físicas são de fato modificadas em cada caso ainda não é conhecida e o método dos corantes solvatocrômicos não se prestam para esse fim, embora sejam muito sensíveis para acusar pequenas oscilações eletrônicas.

O corante Vermelho do Nilo, contudo, mostrou ser o melhor marcador físico-químico identificado nesse estudo, em especial para o rastreamento dos efeitos do *Arsenicum* 6 cH, uma vez que os resultados obtidos com a água reproduziram, ao menos em parte, os resultados obtidos com o medicamento em si, no que diz respeito às variações de absorvância, conforme modelo proposto por Steven Cartwright^{92,170,171}. Estudos sistemáticos a esse respeito merecem ser realizados no futuro, uma vez que tal metodologia representa um recurso preditivo potencial para identificar a atividade das potências

homeopáticas em diferentes situações. A relação biunívoca entre corante e potência homeopática foi caracterizada anteriormente por Mota, em 2018¹⁷².

7. CONCLUSÕES

Os isoterápicos de arseniato de sódio (*Arsenicum*) nas potências 6 cH, 30 cH e 200 cH e o *Ethilicum* 1 cH facilitam o processo adaptativo, inibindo a eclosão de cistos expostos a concentrações tóxicas do arsênio. Contudo, não são observados efeitos sobre a viabilidade e mobilidade dos náuplios após tais tratamentos.

O tratamento da água com *Arsenicum* 30 cH implicou na inversão de proporções entre o conteúdo de arsênio solúvel e precipitado na água, conforme análises realizadas por MEV-EDS e ICP/OES.

O corante solvatocrômico vermelho do Nilo foi um marcador específico para o *Arsenicum* 6 cH, tanto *in natura* quanto na água tratada, sendo uma ferramenta promissora de rastreamento dos efeitos deste medicamento em condições de campo. Tal especificidade corrobora a hipótese de assinatura físico-química para potências homeopáticas específicas.

Tomados em conjunto, os dados obtidos apontam que o isoterápico do arseniato de sódio em diferentes potências são ferramentas potenciais para biorremediação, agindo em diferentes aspectos relacionados à contaminação da água pelo mesmo sal.

8. REFERÊNCIAS

1. UNO. United Nations Environment Assembly of the United Nations Environment Program. Towards a pollution-free planet [Internet]. Nairobi; 4–6 Dec 2017 [citado 2020 maio 04]. Disponível em:
https://papersmart.unon.org/resolution/uploads/25_19october.pdf
2. ONU Meio Ambiente. Poluição causa 12,6 milhões de mortes por ano, alerta agência ambiental da ONU. Nações Unidas Brasil [Internet]. 2017; 16 [citado 2020 maio 04]. Disponível em:
<https://nacoesunidas.org/poluicao-causa-126-milhoes-de-mortes-por-ano-alerta-agencia-ambiental-da-onu/>
3. The Lancet Commission on pollution on health. The Lancet [Internet]. 2018 [citado 2020 maio 2004]; 391: 462-512. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32345-0. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)32345-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)32345-0/fulltext).
4. Souza AKR, Morassuti CY, Deus WB. Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. Acta Biomedica Brasiliensia [Internet]. 2018 [citado 2020 maio 04]; 9(3): 95-106. Disponível em: www.actabiomedica.com.br
5. Gontijo B, Bittencourt F. Arsênio: uma revisão histórica. A. Bras. Dermatol. [Internet]. 2005 [citado 2020 maio 05]; 80 (1): 91-95. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000100014&lng=en.
6. Aronson JK. Melasorprol. Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition). Elsevier [Internet]. 2016 [citado 2020 out 30]; 810-811. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01031-3>
7. Heinz M, Editor. Encyclopedia of Parasitology: A-M. [Internet]. 3rd. New York: Ed. Springer. 2008 [citado 2020 outubro 30]; 376-377. Disponível em: www.academia.edu/encyclopedia_of_parasitology. ISBN: 978-3-540-48994-8.
8. Mandell, Douglas, Bennetis. Principles and Practice of Infectious Diseases. [Internet]. 8ch. Philadelphia: Ed. Elsevier. 2015. [citado 2020 novembro 01]. Disponível em: https://issuu.com/elsevier_saude/docs/sample_mandel_final.
9. Sekkar GN, Watson CP, Fidanboylu M, Sanderson L, Thomas SA. Chapter Eight - Delivery of Antihuman African Trypanosomiasis Drugs Across the Blood-Brain and Blood–CSF Barriers. Advances in Pharmacology, 2014. 71: 245-275. DOI:org/10.1016/bs.apha.2014.06.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1054358914000040>.
10. Bjørklund G, Oliinyk P, Lysiuk R, Rahaman MS, Antonyak H, Lozynska I et al. Arsenic intoxication: general aspects and chelating agents. Archives of Toxicology. 2020; 94: 1879–1897. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02739-w>
11. Moura LL, Silva RF. Medicamentos antineoplásicos no meio ambiente: a contribuição de um hospital universitário de alta complexidade. R. gest. sust.

Ambiente [Internet]. Florianópolis; 2016 [citado 2020 out 15]; 5(1): 313-333. Disponível em: www.portaldeperiodicos.unisul.br

12. Carvalho EV, Ferreira E, Mucini L, Santos. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. Revista Brasileira de Toxicologia 22 [Internet]. . 2009 [citado 2020 out 15]; 1(2): 1-8. Disponível em: <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/lilacs/revbrastoxicol/2009v22n1-2/revbrastoxicol2009v22n1-2p1-8.pdf>

13. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Leucemia. [Internet]. [citado 2020 nov 02]. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia#:~:text=Estimativas%20de%20novos%20casos%3A%2010.810,mulheres%20\(2020%20%2D%20INCA\)](https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia#:~:text=Estimativas%20de%20novos%20casos%3A%2010.810,mulheres%20(2020%20%2D%20INCA))

14. European Medicines Agency. Trisenox. [Internet]. [citado 2020 nov 01]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trisenox-epar-product-information_pt.pdf

15. Manual MSD versão para profissionais da Saúde. Ayurveda. [Internet]. [citado 2020 nov 02]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/t%C3%B3picos-especiais/medicina-integrativa-complementar-e-alternativa/ayurveda>

16. Mikulska MA, Wichman MD, Simmons DL, Phama AN, Clottey V and Fuortesa LJ. Toxic metals in ayurvedic preparations from a public health lead poisoning cluster investigation. International Journal of Occupational and Environmental Health. 2018 [citado 2020 novembro 03]. DOI: 10.1080/10773525.2018.1447880.

17. Panda AK, Hazra J. Arsenical compounds in Ayurveda Medicine: a prospective analysis. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2012; 3(6): 772-776. DOI: 10.7897/2277-4343.03614.

18. Manual MSD versão para profissionais da Saúde. Medicina Tradicional Chinesa. [Internet]. [citado 2020 novembro 04]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/t%C3%B3picos-especiais/medicina-integrativa-complementar-e-alternativa/medicina-tradicional-chinesa>.

19. PiShuang. [Internet]. [citado 2020 04 novembro 04]. Disponível em: <https://www.americandragon.com/Individualherbsupdate/PiShuang.html>

20. Lathoud JA. Estudos de Matéria Médica Homeopática. 2ª ed. São Paulo: Editora Organon, 2004. p: 159 – 183.

21. Silva, IM. Interação In vitro entre compostos orgânicos de Arsênio(V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas. [dissertação]. Maceió - AL: Universidade Federal de Alagoas, Programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia; 2017 [citado 2020 novembro 03]. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1744>

22. Waris M, Baig JA, Uddin S, Kazi T, Solangi IB, Siddiqui S, Afridi HI. Selective electro analytical method for the determination of roxarsone in poultry feed and litter. Food Anal. Methods. 2016; 9: 2142-2151.

DOI: 10.1007/s12161-015-0385-2.

23. Bayse GS, Hammonds-Odie LP, Jackson KM, Tucker DK, Kirilin WG. Permeation of Roxarsone and its metabolites increases caco-2-cell proliferation. *Advances in Biological Chemistry*. 2013; 3: 389-396. DOI: 10.4236/abc.2013.34041.

24. Zhang XY, Zhou MY, Li LL, Jiang YJ, Zou XT. Effects of arsenic supplementation in feed on laying performance, arsenic retention of eggs and organs, biochemical indices and endocrine hormones. *British Poultry Science*. 2017; 58: 63-68. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071668.2016.1216945>
doi.org/10.1080/00071668.2016.1216945

25. Kazi TG, Shah AQ, Afridi HI, Shah NA, Arain MB. Hazardous impact of organic arsenical compounds in chicken feed on different tissues of broiler chicken and manure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013; 87: 120-123. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651312003648>

DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.012

26. Ministério agricultura, pecuária e abastecimento. Portaria número 31 de 29-01-2002. [Internet]. [citado 2020 novembro 12]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/portaria-no-31-de-29-de-janeiro-de-2002.pdf>.

27. US. FOOD & DRUG administration. Animal Food & Feeds. [Internet]. [citado 2020 novembro 13]. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/products/animal-food-feeds>.

28. Wallinga D. Frequently asked questions on Playing Chicken: Avoiding Arsenic in Your Meat. INSTITUTE AGRICULTURE TRD POLICY - Q&A [Internet]. 2006 [citado 2020 novembro 05]. Disponível em: [iatp.org environmentalobservatory.org](http://iatp.org/environmentalobservatory.org).

29. Souza JMO, Carneiro MFH, Paulellia ACC, Grottob D, Magalhães Júnior AM, Barbosa Júnior F et al. Arsênio e Arroz: Toxicidade, Metabolismo e Segurança Alimentar. *Quim. Nova*. 2015; 38 (1): 118-127. [citado 2020 novembro 05]. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000100118.

30. Filho, JFA. Ocorrência de arsênio, cádmio e chumbo em tecidos de aves, suínos, bovinos de corte e equinos no Brasil. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de veterinária da UFMG; 2011. [citado 2020 novembro 06]. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8PBGE5/1/tese_final.pdf.

31. Ferreira AP, Wermelinger ED. Concentrações séricas de metais e suas implicações para a saúde pública. *J Health Sci Inst.* 2013; 31(1):13-9. [citado 2020 novembro 06]. Disponível em: https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2013/01_jan-mar/V31_n1_2013_p13a19.pdf
32. Dang HS, Jaiswal DD, Somasundaram S. Distribution of arsenic in human tissues and milk. *The Science of the Total Environment.* 1983; (29): 171—175. [citado 2020 nov 06]. DOI: 10.1016/0048-9697(83)90042-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6612324/>
33. Curlis D, Klaassen, PD, editors. *Toxicology: the basic science of poisons* [Internet]. New York: Pergamon press; 2008 [citado 2020 novembro 05]. Disponível em: https://jawaidzai.files.wordpress.com/2013/09/casarett_and_doull_s_toxicology-the_basic_science_of_poisons_7th_edition_2008.pdf
34. Carabantes, ALG. Contaminação do ambiente com arsênio e seus efeitos na saúde humana: uma revisão. [Dissertação]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises toxicológicas; 2003 [citado 2020 novembro]. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-29012015-152354/publico/Alexandra_Lena_Galetovic_Carabantes_Mestrado.pdf
35. Reys, MNM. Determinação de elementos traço em alimentos por SS-GFAAS e HG AFS. [Tese]. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em Química da PUC-Rio; 2007. Capítulo1: Introdução; 19-50. [citado 2020 novembro 09]. Disponível em https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/10473/10473_2.PDF
36. ARSÊNIO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2020. [citado 2020 novembro 09]. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Ars%C3%AAnio&oldid=59185940>.
37. Shibata Y, Morita M, Fuwa K. Selenium and Arsenic in Biology: Their Chemical Forms and Biological Functions. *Adv. Biophys.* 1992; (28): 31-80. DOI: 10.1016/0065-227x(92)90022-j. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1442244/>
38. H - Thomas DJ, Styblo M, Lin S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicolo. Appl. Pharmacol.* 2001; 176(2): 127-144. DOI: 10.1006/taap.2001.9258 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11601889/>
- 39 – Ribeiro, CMM. Estabelecimento de uma rotina laboratorial para análise química de sedimentos e sua aplicação a sedimentos continentais do Minho (NW Portugal): contribuição para a reconstituição paleoambiental da região. [Dissertação]. Minho – Portugal: Universidade do Minho, Departamento de

Ciências da Terra, Mestrado em Ciências do Ambiente - Área de Especialização em Qualidade Ambiental; 2006. Capítulo 4: Comportamento geoquímico dos elementos; 37-66. [citado 2020 novembro 09]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/7381>

40. Silva JMB, Barrio R, Moreira JC. Arsênico - saúde: uma relação que exige vigilância. VD [Internet]. 2014 [citado 2020 novembro 06]; 2(1): 57-3. Disponível em:

<https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/130>.

41. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology and Human Health Sciences. The ATSDR 2019 Substance Priority List [Internet]. Atlanta-Georgia; 2019. [citado 2020 maio 05]. Disponível em: www.atsdr.cdc.gov/spl/

42. Rodrigues ASL; Malafaia G. Efeitos da exposição ao arsênio na saúde humana. Rev.saude.com [Internet]. 2008 [citado em 2020 maio 05]; 4(2):148-159. Disponível em: <https://periodicos2.uesb.br/index.php/rsc/article/view/133>.

43. Andrade D, Rocha F, Santos M. A toxicidade do arsênio e sua natureza. Rev. Acad. Oswaldo Cruz [Internet]. 2016 [citado 2020 maio 05]; 10:1-8. Disponível em:

http://www.revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_10_Andrade_Daiene_Flor.pdf

44. Assis, RA. Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS [Tese]. Rio de Janeiro: Pontifícia universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC – RIO; 2007. Capítulo 4: Arsênio: Breve resumo sobre a especiação deste elemento e de suas propriedades toxicológicas, 50-61. Disponível em: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/10019/10019_5.PDF

45. Silva AM. Arsênio: impacto sobre o meio ambiente e a saúde humana. Educação Pública [Internet]. Ago 2016 [citado 2020 maio 06]. 16(17). Disponível em: <https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/16/17/arsnio-impacto-sobre-o-meio-ambiente-e-a-sade-humana>.

46. Meharg AA, Williams PN, Adomako E, Lawgali YY, Deacon C, Villada A, et al. Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. Environ Sci Technol 2009; 43:1612–7. DOI: 10.1021/es802612a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350943/>

47. Rahman MA, Hasegawa H. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. Science of the Total Environment 2011; 409(22): 4645-4655. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.068. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21899878/>

48. Barra CM, Santelli RE, Abrão JJ, Guardia M. Especiação de Arsênio - uma

revisão. Quím. Nova [Internet]. 2000 [citado 2020 maio 07]. 23(1): 58-70. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000100012&lng=en&nrm=iso.

49. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Arsenic [Internet]. Atlanta-Georgia; August 2007. [citado 2020 maio 07]. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3>.

50. Costa DFS, Silva MCC. Arsênio. [citado 2020 mai 07]. Porto; 2015-2016. Disponível em: <https://arseniadc1516.wixsite.com/arsenio>.

51. Sakuma, AM. Avaliação da exposição humana ao arsênio no Alto Vale do Ribeira – Brasil. [Tese]. Campinas – SP: Programa de pós-graduação em Saúde Coletiva da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2004. [citado 2020 novembro 10]. Disponível em <tese%20doutorado%20copia/tese%20arsenio%20e%20alto%20vale%20da%20ribeira.pdf>.

52. Lahuade RA, Crestan TA. Epigenética e câncer [PPT]. [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/286882/>.

53. STRESS OXIDATIVO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2019. [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Stress_oxidativo&oldid=56703238.

54. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev. Nutr. [Internet]. 2010 [citado 2020 Nov 22]; 23(4): 629-643. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013&lng=en.

55. Soares ER, Monteiro EB, Silva RC, Batista A, Sobreira F, Mattos T, Costa CA, Julio B. Daleprane JB. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. Rev. hupe.uerj.br. 2015; 14(3). doi: 10.12957/rhupe.2015.19942. Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/WebRoot/pdf/571_pt.pdf

56. Kosnett MJ. The role of chelation in the treatment of arsenic and mercury poisoning. Journal of Medical Toxicology [Internet]. 2013 [citado 2020 novembro 10]; 9(4): 347-354 DOI: 10.1007/s13181-013-0344-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846971/>.

57. Azevedo MFA. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotóxicológicos. Parte I – metais. Rev Bras Neurol. 2010; 46 (3): 17-31. [citado 2020 novembro 10]. Disponível em:

<http://files.bvs.br/upload/S/0101-8469/2010/v46n3/a1527.pdf>

58. Belon P, Banerjee A, Karmakar SR, Biswas SJ, Choudhury SC, Banerjee P, *et al.* Homeopathic remedy for arsenic toxicity? Evidence-based findings from

a randomized placebo-controlled double-blind human trial. *Sci Total Environ.* 2007; 384(1-3):141-50. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.06.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17628642/>

59. Khuda-Bukhsh AR, Banerjee A, Biswas SJ, Karmakar SR, Banerjee P, Pathak S, *et al.* An initial report on the efficacy of a millesimal potency *Arsenicum Album* LM 0/3 in ameliorating arsenic toxicity in humans living in a high-risk arsenic village. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2011; 9(6): 596-604. DOI: 10.3736/jcim20110604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21669162>

60. Jager T, Scherr C, Simon M, Heusser P, Baumgartner S. Effects of homeopathic *Arsenicum album*, nosode, and gibberellic acid preparations on the growth rate of arsenic-impaired duckweed (*Lemna gibba* L.). *Scientific World Journal.* 2010; 10: 2112-29. doi: 10.1100/tsw.2010.202. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21057725/>

61. Belon P, Banerjee P, Choudhury SC, Banerjee A, BiswasSJ, Karmakar SR, *et al.* Can Administration of Potentized Homeopathic Remedy, *Arsenicum Album*, Alter Antinuclear Antibody (ANA) Titer in People Living in High-Risk Arsenic Contaminated Areas? I. A Correlation with Certain Hematological Parameters. *Advance Access Publication.* 2006; 3(1): 99–107. doi:10.1093/ecam/nek013

62. Coelho CP, Chaulet VRL, Cappelli KLT, Santos RA, Vieira HC, Bernardi MM. Neurobehavioral assessment of *Danio rerio* intoxicated by sodium arsenate and the use of *Arsenicum Album* to reverse the condition of anxiety. *International Journal of High Dilution Research* 2018; 17(2):05-06 Disponível em: www.highdilution.org.

63. Neto RMB. Bases da Homeopatia. [Internet]. Campinas – SP. 2006. [Acesso 2020 novembro 25]. Disponível em: [Bases%20da%20homeopatia_Ruy%20Madsen%20LIVRO.pdf](#)

64. Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. *Rev Ass Med Brasil.*1997; 43(4): 347-51. Disponível em: www.scielo.br/pdf/ramb/v43n4/2026.pdf

65. Pustiglione M. O Organon da Arte de Curar de Samuel Hahnemann para o Século 21. 2ª reimpressão. São Paulo: Editora Organon, 2018.

66. Fontes OL. Farmácia Homeopática: teoria e prática. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2001. 354p.

67. Santos R, Sá FMP. Homeopatia: Histórico e fundamentos. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente* [Internet]. 2014 jun 30 [citado 2020 maio 08]. 5(1): 60-78. Disponível em: <http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/206>.

68. Romanach AK. Homeopatia em 1000 conceitos. 3ª ed. São Paulo: ELCID, 2003. 561 p.

69. Bonamin LV. Descobrimos como a homeopatia funciona. 1ª Ed. São Bernardo do Campo, 2016. p.74. [acesso em 2020 maio 15]. ISBN 978-85-921613-0-9. Disponível em: www.biodilutions.com.
70. Bonamin LV. A Solidez da Pesquisa Básica em Homeopatia. Revista de Homeopatia [Internet]. 2017 [citado 2020 maio 15]. 80:89-97. Disponível em: <https://aph.org.br/revista/index.php/aph/article/view/394>.
71. Bastide M. Teorias interpretativas sobre as ultradiluições e evidências a favor. Cultura homeopática. 2006; 16: 22-30.
72. BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª ed. Brasília, DF; 2011. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf
73. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 971, de 03 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html.
74. Holandino C, Fernandes TB, Siqueira CM, Paiva JP, Homsani F, Barbosa GM, et al. Medicamentos homeopáticos e o paradigma da evidência científica. J Manag Prim Heal Care [Internet]. 2017 [citado 2020 nov 18]; 8(2): 322-332. DOI: <https://doi.org/10.14295/jmphc.v8i2.550>. Disponível em: <https://www.jmphc.com.br/jmphc/article/view/550>
75. Pedalino CMV. Medicamentos homeopáticos em acordes de potência. Cultura homeopática [Internet]. 2006 [citado 2020 novembro 12]; 16:18-21. Disponível em: [Article%20Text-585-1-10-20080201%20\(2\).pdf](#).
76. Cerqueira, EMFP. Seleção de potência de medicamentos homeopáticos: parâmetros mais frequentemente valorizados entre diversos autores. [Tese]. São Paulo; s.n; 2017. 69 p. [citado 2020 novembro 16]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/hom-11707>
77. Oliveira, SM. Triagem de medicamentos homeopáticos que ativam macrófagos com detecção e quantificação de IFN- γ , IL-4 e NO. [Dissertação]. Curitiba – PR: Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas; 2005. [Citado 2020 novembro 16]. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/2934/R%20-%20D%20-%20SIMONE%20MARTINS%20DE%20OLIVEIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
78. Lansky AL. Impossible Cure, The Promise of Homeopathy. USA: R.L Ranch Press - Amazon Kindle edition, 2002.
79. Foltran PF, Okuda CH, Alonso AB, Camerin CR, Chaud MV, Fontes OL. Estudo comparativo do efeito dinâmico de diferentes doses de Arsenicum album 6 cH em ratos intoxicados com arsênico. In: Anais da 58ª Reunião Anual da

SBPC; 2006 julho; Florianópolis – SC. Florianópolis: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; 2006.

80. Shwartz FF, Silva AMCP. Uso de homeopatia na produção agropecuária. In: Posters do Instituto Okos de Agrotecnologia, 2002; Lorena, SP. Disponível em : www.institutookos.org.br/files/Pesquisas/Homeopatiaposter.pdf

81. Carneiro S, Oliveira BG, Ferreira I. Efeito de medicamentos homeopáticos e substâncias em altas diluições em plantas: revisão bibliográfica. Rev. de Homeopatia. 2011; 74 (1/2): 9-32.

82. Casali VWD, Andrade FMC, Cupertino MC. Homeopatia, Agroecologia e Sustentabilidade. Rev. Bras. De Agroecologia [Internet]. 2011 [citado 2020 maio 15]; 6(1): 49-56. Disponível em: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/7693>.

83. Mazón-Suástegui JM, *et al.* Aquacultural Homoeopathy: A Focus on Marine Species. Capítulo 4. [Internet]. 2018 nov. [citado 2020 novembro 19]. DOI: 10.5772/intechopen.78030.

84. Carvallo JAL, Suástegui JMM, Oñate MAH, Ramírez DT, Pacheco FA, Castro RMM, Ortega GFA. Transcriptome analysis of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) juveniles treated with highly-diluted immunomodulatory compounds reveals activation of non-selfrecognition system. PLOS ONE 2020; p. 126. DOI: 10.1371/journal.pone.0233064.

85. Carvallo JAL, Ortega GFA, Ramírez DT, Oñate MAH, Pacheco FA, Corona JLG, Suástegui JMM. Effect of immunomodulatory medication over the general response of juvenile Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). Latin American Journal of Aquatic Research, Evaluation of immunomodulatory drugs 2019; 47(1): 65-77. DOI: 10.3856/vol47-issue1-fulltext-8.

86. Majewsky V, Arlt S, Shah D, Scherr C, Jäger T, Betti L, Trebbi G, Bonamin L, Klocke P, Baumgartner S. Use of homeopathic preparations in experimental studies with healthy plants. Homeopathy 2009; 98(4):228-43. DOI: 10.1016/j.homp.2009.09.012

87. Marcia AL, Cristian AO, Sigrid MC. Aspectos generales de la homeopatía. Rev. méd. Chile [Internet]. 2009 [citado 2020 Nov 22]; 137(1): 115-120. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872009000100018&lng=es.

88. Santos TRB *et al.* Avaliação da eficácia de produtos isoterápicos no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Arq. Inst. Biol. [Internet]. 2015 [citado 2020 maio 17]; 82: 1-5. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572015000100223&lng=en&nrm=iso.

89. Andrade FMC, Casali VWD, Cecon PRC. Crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) tratadas com

isoterápico. Rev. bras. plantas med. [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 19]; 14: 154-158. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000500005&lng=en.

90. Souto PFC. Estudo comparativo da ação terapêutica de medicamentos homeopáticos, bioterapicos e alopaticos em ratos com infecção urinaria por *Esclerichia coli*. 15° Congresso de Iniciação Científica. 2007 outubro 23-25. Piracicaba – SP. 5ª AMOSTRA ACADEMICA UNIMEP. Disponível em:

<http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/5mostra/1/107.pdf>

91. Santana FR, Dalboni LC, Nascimento KF, Konno FT, Alvares-Saraiva AM, Correia MSF, Bomfim MDC, Casarin RCV, Perez EC, Lallo MA, Peres GB, Laurenti MD, Benites NR, Buchi DF, Bonamin LV. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - *Leishmania (L.) amazonensis* interaction *in vitro*. Cytokine, 92: 33-47, 2017. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.01.004.

92. Cartwright SJ. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. Homeopathy [Internet]. 2016 [citado 2020 abril 20]; 105(1):55-65. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>

93. Waisse S, Bonamin LV. Explanatory models for homeopathy: from the vital force to the current paradigm. Homeopathy 2016; 105(3):280-285. DOI: 10.1016/j.homp.2016.02.003.

94. Bonamin LV. Dados experimentais que fundamentam teorias interpretativas sobre ultra-diluições: Tributo a Madeleine Bastide. Cultura Homeopática [Internet]. 2007 [citado 2020 junho 14]; 6(21):29-35. Disponível em: www.highdilution.org

95. Demangeat JL. Gas nanobubbles an aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. Homeopat. 2015; 104:101-115.

96. Chaplin FM. The Memory of Water: an overview. Homeopathy. 2007; 96: 143–150. DOI:10.1016/j.homp.2007.05.006.

97. THE BIOLOGY PROJECT. Department of Biochemistry and Molecular Biophysics. The Chemistry of water [Internet]. Arizona: University of Arizona; 2003 jan [citado 2020 maio 24]. Disponível em: <http://www.biology.arizona.edu>

98. Reis, AS. Ligações hidrogênio no cotidiano – uma contribuição para o ensino de química [dissertação]. Campinas/SP: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química departamento de Química Inorgânica; 2008 [citado 2020 abril 20]. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249087>

99. Ynnon T. Very dilute aqueous solutions-structural and electromagnetic phenomena. Water Journal 2017; 9:28-66. DOI: 10.14294/WATER.2017.4.

100. Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. Homeopathy 2014;103(1):4-21.

101. Del Giudice E. Is the "memory of water" a physical impossibility? In: Endler, P.C, Schulte J, editors. Ultra-high dilution - Physiology and Physics. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994. p.117- 120.
102. Roy R, Tiller WA, Bell I, Hoover M R. The Structure of Liquid Water; Novel insights from materials research; potential relevance to homeopathy. Materials Research Innovations. 2005; 9(4): 98-103.
103. Bellavite P, Signorini A. The Emerging Science of Homeopathy. Complexity, Biodynamics, and Nanopharmacology. 2thed. Berkeley: North Atlantic Books; 2002. 408p.
104. Ynnon T. Liquids prepared by serially diluting and vigorously shaking of aqueous solutions: unveiling effects of the solute on their properties. Water Journal 2020; 10:115-134. DOI: 10.14294/2019.2.
105. Nóbrega DE. A memória da água e outras hipóteses para compreensão do possível mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos: uma revisão. [citado 2020 maio 18]. João Pessoa; 2015. Disponível em <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/928/1/DEN18052015.pdf>
106. Fisher P. The Memory of Water: a scientific heresy? [Editorial]. Homeopathy 2010; 96: 141–142.
107. Augusto R. A Ciência na homeopatia [Internet]. Lisboa: Associação Portuguesa de Homeopatia; [publicado 2010 dez 31; citado 2020 maio 12]. Disponível em:
<http://aphomeopatia.weebly.com/uploads/3/4/2/5/3425631/homeopatia-como-funciona.pdf>
108. Bellavite P, Marzotto M, Olioso D, Moratti E, Conforti A. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. Homeopathy. 2014; 103(1):22-43. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.002.
109. Silva, WRG. As ultradiluições e as estruturas virtuais quânticas – estudo de metanálise [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências da Saúde/ Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos – FACIS/IBEHE; 2004 [citado 2020 maio 27]. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/17880823/AS-ULTRADILUICOES-E-AS-ESTRUTURAS-VIRTUAIS-QUANTICAS-ESTUDO-DE-METANALISE-WALMIR-R-G-SILVA-completo>
110. Miranda AR. Water and High Dilutions Phenomenology: Physical Characterization. In: Bonamin L.V. (Ed.) Signals and Images. Contributions and Contradictions in High Dilution Research. 2008; Dordrecht. Springer. pp 49-63.
111. Teixeira MZ. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. Rev Med. 2006; 85(2): 30-43.
112. Del Giudice E, Preparata G, Vitiello G. Water as a free electric dipole laser. Physical Review Letters 1988; 61: 1085-1088.

113. Guedes JRP, Bonamin LV, Capelozzi VL. Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses Research Review. *Homeopathy* 2018; 107(3):172-180.
114. Elia V, Napoli E, Germano R. The 'Memory of Water': an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. *Homeopathy* 2007; 96:163–169.
115. Del Giudice E, Doglia S, Milani M, Vitiello G (1988). Structures, correlations, and electromagnetic interactions in living matter: theory and applications. In: Frohlich H (Ed.) *Biological Coherence and Response to External Stimuli*. Springer-Verlag, Berlin, p. 49.
116. Montagnier L, Issa JA, Ferris S, Montagnier JL, Lavallee C. Electromagnetic Signals Are Produced by Aqueous Nanostructures Derived from Bacterial DNA Sequences. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2009; 1: 81–90 DOI: 10.1007/s12539-009-0036-7
117. Domingues, S. Rebote de plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) tratadas com altas diluições dinamizadas [dissertação]. Lages - SC: Universidade de Santa Catarina – UDESC; 2017 [citado 2020 abril 25]. Disponível em:
https://www.udesc.br/arquivos/cav/id_cpmenu/1343/DissSergiocorre_ofinal_15675400390944_1343.pdf
118. Rey L. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. *Physica A*. 2003; 323: 67-74.
119. Rao ML, Roy R, Iris B. Characterization of the structure of ultra-dilute sols with remarkable biological properties. *Material Letters* 2008; 62:1487–1490.
120. Chikramane PS, Suresh AK; Bellare JR; Kane SG. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. *Homeopathy* 2010; 99:231-242.
121. Agarwal A, Ng WJ, Liu Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. *Chemosphere* 2011; 84: 1175–1180.
122. Takahashi M. Base and technological application of micro-bubble and nanobubble. *Mater. Integration* 2009; 22: 2–19.
123. Alheshibri M, Qian J, Jehannin M, Craig VS. A History of Nanobubbles. *Langmuir* 2016; 32(43):11086-11100. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02489.
124. Etchepare, RG. Geração, caracterização e aplicações das nanobolhas na remoção de poluentes aquosos e reúso de água por flotação [Tese]. Porto Alegre – RS: Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em Engenharia de Minas Metalúrgica e de Materiais; 2016. [citado 2020 maio 20]. Disponível em:

<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/149872>

125. Linnert HV. Estabilidade coloidal [Internet]. Power point slides [citado 2020 maio 12]. Disponível em:

<http://www.usp.br/massa/2013/qfl2452/pdf/EstabilidadeColoidal.pdf>

126. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. Revista da associação Médica Brasileira. 1997; 43(1): 61-8.

127. Vizzotto, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante [Internet]. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017: 10p. [citado 2020 maio 10]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2017/10/antioxidantesElissa.pdf>

128. Casagrande C. Um pouco mais sobre nanobolhas – parte 2 – Sua capacidade de transferência de gases para um meio líquido [Internet]. Fenda Dupla; [publicado 2018 set 27; citado 2020 maio 12]. Disponível em:

<https://fendadupla.wordpress.com/2018/09/27/nb4/>

129. Silva, RTB. Ultradiluições de Magnesia phosphorica 12 C e Ferrum metallicum 12 C em SDS e nos sistemas hidropônicos de soja e feijão [Tese]. Viçosa – MG: Programa de pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa; 2008 [citado 2020 abril 30]. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1104/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

130. Lohse D. Sonoluminescence: Cavitation hots up. Nature 2005; 434:33–34.

131. Seddon JRT, Lohse D, Ducker WA, Craig VSJ. A deliberation on nanobubbles at surfaces and in bulk. Chem Phys Chem 2012; 13:2179–2187.

132. Zhang XH, Wu ZH, Zhang XD, Li G, Hu J. Nanobubbles at the interface of hopg and ethanol solution. International Journal of Nanoscience. 2005; 4(3): 399–407.

133. Holandino C. A Homeopatia e os Modelos Experimentais para a Compreensão das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Sistemas Dinamizados. Revista de Homeopatia [Internet]. 2009 [citado 2020 novembro 15]; 72(3/4): 15-18. Disponível em: <http://revista.aph.org.br/index.php/aph/article/view/25>

134. Fisher P. The memory of water: a scientific heresy? Homeopathy 2007; 96:141-2. DOI:10.1016/J.HOMP.2007.05.008.

135. Leonardo N. Como eclodir e criar *Artemia salina* [Internet]. Na zona entre marés... projeto fauna e flora do substrato rochoso da zona entre marés. Aquário ESHC. [publicado 2011 junho 09; citado em 2020 maio 18]. Disponível em:

<https://nazonaentremares.files.wordpress.com/2011/06/artemia-salina.pdf>.

136. Cunha BM. Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa*. [citado 2020 maio 18]. Porto Alegre; 2011. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/32773/000786252.pdf?s>

137. Vinatea JE. Artemia: um ser vivo excepcional [Internet]. Panorama da Aquicultura [publicado 1994 out 31; citado 2020 abril 10]. <http://www.panoramadaaquicultura.com/Paginas/Revistas/25/artemia.asp>

138. Schatzer CAF. Efeitos da exposição a fotoprotetores em *Artemia salina* Leach: estudos ecotoxicológico e comportamental [dissertação]. Santo André-SP: Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência da Fundação Universidade Federal do ABC [citado 2020 maio 26].

139. Mayorga P, Pérez KR, Cruz SM, Caceres A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thannocephalis platyurus* for plant extract toxicity screening. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(2):897-903.

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

141. Lavens P, Sorgeloos P (Eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No 361. Rome: FAO; 1996. 295p.

142. Podrabsky JE, Hand SC. Physiological strategies during animal diapause: lessons from brine shrimp and annual killifish. The Journal of Experimental Biology 2015; 218:1897-1906.

143. Gajardo GM, Beardmore JA. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. www.frontiersin.org. 2012; 3 (Article 185): 1- 8.

144. King AM, Toxopeus J, MacRae TH. Artemin, a diapause-specific chaperone, contributes to the stress tolerance of *Artemia franciscana* cysts and influences their release from females. The Journal of Experimental Biology 2014; 217: 1719-1724.

145. King AM, Toxopeus J, MacRae TH. Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined artemia embryos. FEBS Journal. 2013; 280: 4761–4772.

146. Clegg JS. Protein Stability in Artemia Embryos During Prolonged Anoxia. Biol Bull. 2007; 212: 74-81.

147. CRIPTOBIOSE. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2020. [citado 2020 novembro 16] Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Criptobiose&oldid=57891065>>.

148. De Carli, GJ. Efeitos biológicos e bioquímicos do óxido de deutério e seu

- possível impacto na anidrobiose. [citado 2020 novembro 16]. Ribeirão Preto – SP: 2015. Disponível em: www.tcc.sc.usp.br/tce/publico/GabrielJoseDeCarli
149. Borges G. Análises do silenciamento de genes LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) em *Panagrolaimus Superbus*: efeitos no desenvolvimento, morfologia e comportamento. [citado 2020 maio 21]. Ribeirão Preto-SP; 2013. Disponível em: <http://www.tcc.sc.usp.br/tce/disponiveis/59/59011300/tce-16042014-105639/>
150. Malitan HS, Cohen AM, MacRae TH. Knockdown of the small heat-shock protein p26 by RNA interference modifies the diapause proteome of *Artemia franciscana*. *Biochem Cell Biol*. 2019; 97(4):471-479.
151. Tan J, MacRae TH. The synthesis of diapause-specific molecular chaperones in embryos of *Artemia franciscana* is determined by the quantity and location of heat shock factor 1 (Hsf1). *Cell Stress and Chaperones* 2019; 24:385–392.
152. 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.
153. Rowarth NM, MacRae TH. Post-diapause synthesis of ArHsp40-2, a type 2 J-domain protein from *Artemia franciscana*, is developmentally regulated and induced by stress). *PLOS One*. 2018; 13(7): e0201477.
154. King AM, MacRae TH. The Small Heat Shock Protein p26 Aids Development of Encysting Artemia Embryos, Prevents Spontaneous Diapause Termination and Protects against Stress. *PLOS One*. 2012; 7(8): e43723.
155. Ferreira PVC, Amorim ALA, Pessoa WVN, Ramos JAA. Influência das fases da lua na abundância de *Larimus breviceps* na zona de arrebenção da praia de Miramar-PB. *Revista Principia* [Internet]. 2017 [citado 2020 maio 31]; 36: 107-115. Disponível em: <https://docplayer.com.br/59470314-Influencia-das-fases-da-lua-na-abundancia-de-larimus-breviceps-na-zona-de-arrebentacao-da-praia-de-miramar-pb.html>
156. Silveira FL. As variações dos intervalos de tempo entre as fases principais da lua. *Rev. Bras. Ensino Fís* [Internet]. 2001 [citado 2020 maio 13]; 23(3): 300-307. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-11172001000300008&lng=pt&nrm=iso
157. BRASIL. Observatório Nacional. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Fases da Lua [Internet]. [citado 2020 junho 23]. Disponível em: http://www.on.br/daed/pequeno_cientista/conteudo/revista/pdf/fases_lua.pdf
158. Takemura A, Rahman MS, Park YJ. External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *Journal of Fish Biology* [Internet]. 2010 [citado 2020 maio 16]; 76: 7–26. Disponível em: www.interscience.wiley.com

159. Camargo WN, Van Vooren L, Sorgeloos P. Effects of lunar cycles on *Artemia* density in hypersaline environments. *Hydrobiologia* [Internet]. 2002 [citado 2020 maio 30]; 468: 251–260. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015283132695#citeas>
160. Mohammad, SN. Avaliação da proteção à toxicidade do cloreto de chumbo por isotérmico em modelo de *Artemia salina* [Dissertação]. São Paulo: Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP; 2020 [citado 2020 junho 30]. Disponível em: <http://repositorio.unip.br/programa-de-pos-graduacao-stricto-sensu-em-patologia-ambiental-e-experimental/avaliacao-da-protecao-a-toxicidade-do-cloreto-de-chumbo-por-isoterapico-em-modelo-de-artemia-salina>
161. Maliska AM. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise. [Internet]. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Departamento de Engenharia Mecânica – EMC Laboratório de Materiais – Labmat Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens – LCMAI. [citado 2020 novembro 15]. Disponível em: http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf
162. Duarte LC, Juchem PL, Pulz GM, Brum TMM, Chodur N, Liccardo A, *et al.* Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. *Pesquisas em Geociências* [Internet]. 2003 [citado 2020 junho 02]. 30(2): 3-15. Disponível em: <http://seer.ufrgs.br/PesquisasemGeociencias/article/view/19585>
163. Laboratório de recursos analíticos e de calibração – LRAC - Faculdade de Engenharia Química – FEQ. Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva de Raios X - MEV/EDS. Campinas (SP): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. [publicado 2017 set 28; citado 2020 jul 20]. Disponível em: https://www.feq.unicamp.br/lrac/documentos/tecnica_mev_dvs.pdf.
164. Calorimetria e espectrofotometria. [Internet]. [acesso 2020 novembro 16]. Disponível em: <https://www.doccity.com/pt/colorimetria-e-espectro-uv-vis/4794501/>
165. Bergamin Filho H, Krug FG, Zagatto EAG, Rocha FRP. Espectrofotometria no ultravioleta e visível. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. 2010. [Internet]. [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4275863/mod_resource/content/1/Apostila-espectrofotometria.pdf.
166. Almeida JM. Espectrofotometria UV -Vis [Internet]. Power Point slides. [publicado 2018 janeiro; citado em 2020 junho 2016]. Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula-2-UV-Vis-1o-Sem-2018-parte-1.pdf>.
167. APLICAÇÕES DE ESTUDOS BIOQUÍMICOS QUANTITATIVOS EM

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE. [Internet]. [citado 2020 novembro 16]. Disponível em: [www.fara.edu.br > sipe > renefara > article > download](http://www.fara.edu.br/sipe/renefara/article/download)

168. Brito AMMB, Santos HF, Cardoso ILN. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE ESTADOS AGREGADOS DE CORANTES. In: Teorias e método da Biofísica. Maravieski SP org. [Internet]. Editora Atena. 2019. [citado 2020 novembro 18]. DOI 10.22533/at.ed.8931914035. Disponível em: [/E-book-Teorias-e-Métodos-da-Biofísica.pdf](#)

169. CROMÓFORO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2017. [citado 2020 maio 10]. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Crom%C3%B3foro&oldid=49317114>

170. Cartwright SJ. Interaction of homeopathic potencies with de the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchstone. Part 1: pH studies. Homeopathy [Internet]. 2017 [citado 2020 abril 20]. 106(1):37-46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28325223/>

171. 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 Succused Solutions. Homeopathy [Internet]. 2018 [citado 2020 abril 20]; 07(1):19-31. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29528475/>

172. Mota, HMG. Análise físico-química do medicamento homeopático Antimonium crudum quanto à ressonância elétrica para compreensão do mecanismo de ação [Relatório de Iniciação Científica]. São Paulo: Universidade Paulista – UNIP; 2018 [citado 2020 abril 25].

173. BRASIL. ANVISA. Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3 ed., 2011. [citado 2020 junho 12]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259147/3a_edicao.pdf/cb9d5888-6b7c-447b-be3c-af51aaae7ea8. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.

174. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO. Instrução normativa No 11, de 08 de junho de 2005. Anexo IV. Tabela de potências mínimas para manipulação de produtos veterinários homeopáticos. 2005. [citado 2020 junho 12]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucaonormativa-mapa-no-11-de-08-06-2005.pdf>.

175. Gordinho, AA. Efeitos do isoterápico na intoxicação de *Artemia salina* com cloreto de mercúrio [Dissertação]. São Paulo: Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP; 2020 [citado 2020 junho 02]. Disponível em: <http://repositorio.unip.br/programa-de-pos-graduacao-stricto-sensu-em-patologia-ambiental-e-experimental/efeitos-do-isoterapico-na-intoxicacao-de-artemia-salina-com-cloreto-de-mercurio>

176. NASA. Solar System exploration. What's is a Supermoon? [Internet]. NASA Science; [publicado 2019 abril 28; citado 2020 jul 22]. Disponível em <https://solarsystem.nasa.gov/news/922/what-is-a-supermoon/>

177. Gonçalo, CG. Análise do comportamento natatório de larvas de peixes marinhos com técnicas de imageamento de alta frequência. [Tese]. São Paulo: Instituto oceanográfico da USP. Área oceanografia biológica; 2015 [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21134/tde-07052015-105843/publico/Tese_Cassia_Gocalo_Corrigida.pdf

178. Oliveira FS, Vargas S, Watanabe M, Stivanello ME, Roloff ML. Desenvolvimento de um Sistema para Contagem Automática de Microcrustáceos da Espécie *Artemia Salina* Empregando Visão Computacional. Revista de Sistemas e Computação, Salvador. 2017; 7(2): 323-336. [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/rsc>

179. Noldus LPJJ, Spink AJ, Ruud AJ, Tegelenbosch RAJ. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers 2001; 33 (3): 398-414

180. Gu Țu CM, Olaru OT, Purdel NC, Ilie M, NeamȚu MC, Miulescu RD, Avramescu ET, Margină DM. Comparative evaluation of short-term toxicity of inorganic arsenic compounds on *Artemia salina*. Rom J Morphol Embryol 2015; 56(3):1091-6.

181. Bastos, AM. Influência do ciclo lunar, temperatura, iluminação e ablação ocular no crescimento, reprodução e sobrevivência de *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) [Tese]. Macapá - AP: Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal da Fundação Universidade Federal do Amapá; 2016 [citado em 2020 abril 22]. Disponível em: <https://www2.unifap.br/bionorte/files/2019/02/TESE-FINAL-COMPLETA-Argemiro-Midon%c3%aas-Bastos.pdf>

182. TERRA. CIÊNCIA. Maior superlua de 2019: entenda o fenômeno astronômico que ocorre nesta terça [Internet]. [publicado 2019 fev 2019; citado 2020 jul 22]. Disponível em: <https://www.terra.com.br/noticias/ciencia/maior-superlua-de-2019-entenda-o-fenomeno-astronomico-que-ocorre-nesta-terca,0d35c3361fd7f5b49c46b752a34e3c1ajv2b6q5r.html>

183. Silveira FL. Marés, fases principais da lua e bebês. Cad. Bras. Ens. Fís. [Internet]. 2003 [citado 2020 jul 22]; 20(1): 10-29. Disponível em: https://www.if.ufrgs.br/~lang/Textos/Fases_da_Lua_bebes.pdf

184. Benedito PMP, Albarici FL, Trabanco JLA. Maré terrestre: diferença entre o modelo teórico e modelos experimentais no Estado de São Paulo. In: Anais do COBRAC; 2016; Florianópolis, SC. Disponível em: <http://www.ocs.cobrac.ufsc.br/index.php/cobrac/cobrac2016/paper/view/215/14>

185. Oliveira MJ, Carneiró CDR, Vecchia FAZ, Baptista GMN. Ciclos climáticos e causas naturais das mudanças do clima. Terra e Didática. [Internet]. 2017 [citado 2020 jul 22]; 13(3): 149-184. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/td/article/view/8650958>

186. Molion LCB. Gênese do El Niño. Rev. Bras. Climatologia [Internet]. 2017 [citado 2020 jul 22]; 21: 1-4. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/revistaabclima/article/view/51873/33551>

187. Braga FLS, Moreira RF, Zanetti J, Poz WRD. Análise do efeito da superlua no deslocamento devido às marés terrestres em estações da RBMC. In: Anais do IV Simpósio Brasileiro de Geomática – SBG, II Jornadas Lusófonas - Ciências e Tecnologias de Informação Geográfica – CTIG; 2017; Presidente Prudente, SP. p. 411-418. Disponível em: http://docs.fct.unesp.br/departamentos/cartografia/eventos/2017_IV_SBG_artigos/2017_SBG_CTIG_paper_53.pdf

188. Lima JLDS. Efeito da interação entre fragmentação de cladódios, fases lunares e preparados homeopáticos na produção de mudas de palma forrageira [Monografia]. Universidade Federal da Paraíba. Ciências Biológicas. Areia – PB; 2019. [citado 2020 novembro 18]. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/16422/1/JLDSL12112019%20-%20MB230.pdf>

189. Main D. Porque as ostras fecham durante a lua cheia – e outros efeitos lunares curiosos nos animais [Internet]. National Geographic; [publicado 2019 jun 03; citado 2020 jul 22]. Disponível em: <https://www.nationalgeographicbrasil.com/animais/2019/05/por-que-ostras-fecham-durante-lua-cheia-e-outros-efeitos-lunares-curiosos-nos>

190. Darbyshire AK, Oliver KH, Dupont WD, Plummer WD, Jones CP, Boyd KL. Anesthesia and Euthanasia of Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). J Am Assoc Lab Anim Sci. 2019; 58(1):58-64. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000040.

191. De A, Das D, Dutta S, Chakraborty D, Boujedaini N, Khuda-bukhsh AR. Potentiated homeopathic drug Arsenicum album 30C inhibits intracellular reactive oxygen species generation and up-regulates expression of arsenic resistance gene in arsenite-exposed bacteria *Escherichia coli*. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. Journal of Chinese Integrative Medicine. 2012; 10(2):210-27.

DOI: [10.3736/jcim20120212](https://doi.org/10.3736/jcim20120212)

192. Ives EC, Couchman IMS, Reddy L. Therapeutic effect of *Arsenicum album* on leukocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(3), 3979-3987. DOI: [10.3390/ijms13033979](https://doi.org/10.3390/ijms13033979)

193. Santos MG. Tratamento homeopático na remediação de solos contaminados por metais cultivados com soja e trigo [Dissertação]. Marechal Cândido Rondon – PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2016 [Citado

2020 junho 30]. Disponível em:
[http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1313/1/Marcelo Santos 2016](http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1313/1/Marcelo_Santos_2016)

194. Betti L, Zurla M, Trebbi G, Brizzi M, Borghini G, Borghini F. Extremely low Doses of Arsenic Affect in vitro Pollen Germination. *Forsch Komplementmed*. 2013; 20:254-260.
195. Ücker A, Baumgartner S, Sokol A, Huber R, Doesburg P, Jäger T. Systematic Review of Plant-Based Homeopathic Basic Research: An Update. *Homeopathy*. 2018; 107(2):115-129. DOI: 10.1055/s-0038-1639580.
196. Jäger T, Scherr C, Shah D, Majewsky V, Wolf U, Betti L, Baumgartner S. The use of plant-based bioassays in homeopathic basic research. *Homeopathy*. 2015; 104(4):277-82. DOI: 10.1016/j.homp.2015.06.009.
197. Bonamin LV, Pedro RRP, Mota HMG, Aguiar MSC, Pinto SAG, de Souza J, de Oliveira LHS, Aparicio AC, Peres GB, Suffredini I, Dutra-Correa M, Cartwright SJ. Characterization of Antimonium crudum Activity Using Solvatochromic Dyes. *Homeopathy*. 2020; 109(2):79-86. DOI: 10.1055/s-0039-1697000.
198. Aparicio ACC, de Oliveira LHS, Silva JS, Coelho CP, Pinheiro SR, Souza MF, Suffredini IB, Cartwright SJ, Bonamin LV. Interaction between Solvatochromic Dyes and Water Sampled from a Natural Source Treated with High Dilutions of Phosphorus. *Homeopathy*. 2020; 109(3):126-132. DOI: 10.1055/s-0039-3400255.