UNIVERSIDADE PAULISTA

CARACTERIZAÇÃO DE CORANTES SOLVATOCRÔMICOS COMO MARCADORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE SOBRENADANTES

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

SANDRA AUGUSTA GORDINHO PINTO

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE PAULISTA

CARACTERIZAÇÃO DE CORANTES SOLVATOCRÔMICOS COMO MARCADORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE SOBRENADANTES

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

SANDRA AUGUSTA GORDINHO PINTO

São Paulo

2021

Pinto, Sandra Augusta Gordinho.
Caracterização de corantes solvatocrômicos como marcadores físico-químicos de medicamentos homeopáticos e de amostras biológicas de sobrenadantes / Sandra Augusta Gordinho Pinto. - 2020.
76 f. : il. color.

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2021.
Área de concentração: Homeopatia.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Leoni Villano Bonamin.

1. Homeopatia. 2. Espectrofotometria de luz visível. 3. C*orantes solvatocrômicos*. 4. Propriedades físico-químicas. 5. Mecanismo de ação. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Título.

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

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em:____/____/____

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

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

_____
Prof.º Dr Jasper José Zanco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof.º Dr Giovani Bravin Peres
Universidade Paulista-UNIP

_____
Prof.ª Dra. Adriana Ramos de Miranda
Universidade Paulista-UNIP

_____
Prof.ª Eliana Aparecida Perrone (SUPLENTE)
Universidade do Sul de Santa Catarina-UNISUL-ANIMA

_____
Prof.º Dr Edgard Costa de Vilhena (SUPLENTE)
Universidade do Sul de Santa Catarina-UNISUL-ANIMA

“An understanding of, and explanation for, the action of homeopathic medicines would not only revolutionize the status of homeopathy in the world but also profoundly improve prescribing methods and our ability to treat illness.”

Dr. Steven Cartwright PhD

"Uma compreensão e uma explicação para a ação dos medicamentos homeopáticos não apenas revolucionariam o status da homeopatia no mundo, mas também melhorariam profundamente os métodos de prescrição e nossa capacidade de tratar doenças".

Dr. Steven Cartwright PhD

Agradecimentos

À Prof.ª Dra. Leoni Villano Bonamin pelos conhecimentos transmitidos, ensinamentos, orientações e mentoria, minha referência em pesquisa. Inspiração no caminho a seguir, minha admiração e gratidão.

À Profa Dra Ivana Barbosa Suffredini agradeço a colaboração, disponibilidade, carinho e apoio na execução dos ensaios deste estudo, gratidão.

À ABFH - Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas - pelo apoio financeiro dispensado ao nosso projeto, que recebeu carinhosamente a alcunha de “projeto arco-íris”.

À UNIP pela bolsa de estudos concedida, por me acolher e incentivar em novas pesquisas e pela realização deste sonho, o Doutorado.

À farmácia Dhermus, Londrina, Paraná, Brasil, pela gentiliza do fornecimento gratuito de medicamentos utilizados. À farmácia HN Cristiano, São Paulo, Brasil, pela manipulação de medicamentos e veículos e pela gentiliza do fornecimento gratuito dos insumos, fundamentais na execução deste trabalho.

À farmacêutica Prof.a. Dra. Amarilys de Toledo Cesar pela atenção e cuidados na disponibilização dos medicamentos.

Aos colegas Adalberto do Carmo Braga von Ancken e Mirian Yaeko Nagai por doar gentilmente porte dos sobrenadantes utilizados na realização dos experimentos.

Aos colegas Adalberto do Carmo Braga von Ancken, Suham Nowrooz Mohammad e Jefferson Souza Silva, pela colaboração e execução dos experimentos realizados, meu profundo agradecimento.

Agradeço aos funcionários da UNIP Sandra Kallil, Cleide e tantos outros, indispensáveis para realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG DIN (água dinamizada)

ASP (Aspirina)

BCG (bacilo *Calmette-Guérin)*

BDN (*(+) 4-(bis-(4-(dimetilamine) fenil) metilene) -1(4h) -naftalenone)*)

cH (diluição centesimal Hahnemanniana)

Cumarina (*coumarine 7)*

DIN (dinamizado)

E CUN (*Encephalitozoon cuniculi*)

EF (E*lectric Flow* - corrente elétrica)

EMS (sinais eletromagnéticos)

ET33 ((-) *2,6-dichlor-4-(triphenilpiridinium-1-il) -phenolate)*

H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio)

HA (Hidroalcóolica)

HN (HN Cristiano farmácia)

IL-10 (interleucina)

LPS (lipopolissacárideo extraído de *Eschericea. coli*)

M (diluição milesimal)

MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos)

MED (Medicamento)

MO (Macrófago)

NÃO (Não Responsivo)

NBs (nanobolhas)

nm (nanômetros)

NNDMIA (*n, n-dimethylindoaniline)*

NO (Óxido Nitríco)

NPs (nanopartículas)

µl (microlitro)

µg (Micrograma)

PA (puro para análise)

PHOS (*Phosphorus*)

QED (eletrodinâmica quântica**)**

ROS (espécies reativas de oxigénio - *Reactive Oxygen Species*)

Red Nile (Vermelho do Nilo)

RNM (ressonância nuclear magnética)

Rodanina (*rhodanine-5 (4-dimetilaminebenzilidene))*

AC (*Antimonium crudum*)

SC (Controle Sistemático)

Sil / SIL (*Silicea terra)*

SN (sobrenadante)

SNs (sobrenadantes)

SUCC (sucussionada)

SUCC WAT (água sucussionada)

TNF-α (fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa))

UV/VIS (espectroscopia no ultravioleta visível)

VM (Violeta Metileno (+))

Zinc / ZINC *(Zincum metallicum)*

λ (Comprimento de onda)

Φ (Fluxo magnético)

- (Menos)

(altamente significante em relação a todos os grupos)

*****(significante)

+ (Mais)

< (menor)

> (maior)

± (Mais ou Menos)

≈ (semelhante ao controle)

↑(aumento)

↓(diminuição)

Glossário		
Palavra-chave	**Conceito/definição**	**Bibliografia**
Homeopatia	É uma especialidade médica e farmacêutica que consiste em administrar doses diluídas e dinamizadas (ou mínimas) do medicamento ao enfermo, em concordância com o princípio de similitude, ou seja, o conceito de que do semelhante cura o semelhante. É baseada em metodologia de experimentação clínica própria, utilizando-se doses mínimas de substâncias ou fármacos no indivíduo sadio para diminuir efeitos tóxicos e, posteriormente, ser aplicada no indivíduo doente.	(BONAMIN, 2016) (FONTES, 2018)
Dinamização	É a preparação de uma droga ou medicamento pelo procedimento de diluição associado à sucussão de substâncias solúveis ou diluição associada à trituração de substâncias insolúveis.	(BONAMIN, 2016)
Sucussão	É o ato de agitar vigorosamente uma solução. Está relacionada ao processo das diluições sucessivas.	(FONTES, 2018)
Escalas	Indicam a razão da diluição empregada no preparo de medicamentos homeopáticos. São elas: centesimal hahnemanniana (cH ou CH) isto é, 1 parte da substância para 100 partes do solvente; decimal hahnemanniana sendo (DH), 1 parte da substância para 10 partes do solvente e cinquenta-milesimal (LM) ou seja, 1 parte da substância para 50.000 partes do solvente).	(FONTES, 2018)
Medicamento dinamizado	É aquele elaborado de acordo com a farmacotécnica homeopática empregando o método de diluição (solúveis) ou trituração (insolúveis).	(FONTES, 2018)
Potência homeopática	Consiste na quantidade de vezes em que o medicamento foi dinamizado e é demonstrada pelo número de vezes e por letras Exemplos: 5 CH, 6 DH.	(BRASIL, ANVISA, 2017)
Sondas moleculares	Metodologia usada para se compreender as interações intermoleculares em fase líquida. Estas sondas são moléculas que exibem características espectroscópicas diferentes dependendo das propriedades do meio solubilizante. Assim, o aparecimento de novas bandas espectrais, o deslocamento no comprimento de onda de absorção e/ou de emissão e as mudanças na intensidade de emissão fornecem uma indicação do microambiente ao redor da sonda. As sondas moleculares têm sido	(SUPPAN, GHONEIM, 1997)

	usadas para detectar e medir a concentração de íons e cátions de importância biológica e outras substâncias.	
Solvatocromismo	É um acentuado deslocamento na posição ou na intensidade de uma banda de absorção UV-VIS, relacionada à uma mudança na polaridade do meio.	(REICHARDT, 1988)
Espectrofotômetro	É um equipamento usado para designar os valores de transmitância (luz transmitida) e absorbância (luz absorvida) de uma solução em um ou mais comprimentos de onda. Mensura a intensidade da luz absorvida (fótons) depois de passar pela amostra ou a quantidade/concentração de uma substância química conhecida.	(COMPRI-NARDY, 2009)
Corantes solvatocrômicos	Os corantes solvatocrômicos são caracterizados por possuírem um grupo doador de elétrons e um grupo aceitador de elétrons que interagem com o meio.	(REICHARDT, 2008)
Espectrofotometria	É um método que estuda a interação da luz com a matéria e a permitindo a observação de diversas análises. Cada composto químico absorve, transmite ou reflete luz ao longo de um determinado intervalo de comprimento de onda. Pode ser usada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção e transmissão de luz que passa através da amostra.	(COMPRI-NARDY, 2009)
Absorbância	É a capacidade de absorção de luz por uma determinada espessura de um material em uma fração da energia luminosa. Esta capacidade de absorção de luz ocorre quando uma solução é submetida ao longo de uma faixa de comprimentos de onda eletromagnética. O espectro de absorção permite analisar qual a faixa de comprimento de onda em que tal composto apresenta maior afinidade de absorção. A representação gráfica dos valores de comprimento de onda (λ) versus absorbância é denominada espectro de absorção.	(COMPRI-NARDY, 2009)

Sumário

Agradecimentos.....6
1. Introdução e revisão da literatura 14
2. Objetivos..... 21
2.1. Objetivo geral 21
2.2. Objetivos Específicos 21
3. Métodos 22
3.1. Ética 22
3.2. Padronização do método e desenho experimental..... 22
3.3. Preparação das amostras para análise 25
3.4. Codificação dos frascos 26
3.5. Espectrofotometria com corantes solvatocrômicos..... 27
3.6. Análise Estatística 30
4. Resultados 31
4.1. Análise preliminar dos padrões de cubetas..... 31
4.2. Controle sistemático..... 32
4.3. Aspirina 15cH e sobrenadantes de macrófagos tratados com Aspirina 15cH, desafiados ou não com LPS 33
4.4. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* por 24 horas e amostras dos próprios medicamentos..... 39
4.5. Avaliação das amostras de SNs de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* em diferentes tempos 42
4.6. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* e amostras dos próprios medicamentos. 45
4.7. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Zincum metallicum* e amostras dos próprios medicamentos 47
4.8. Estudo comparativo entre amostras de *Silicea terra* e *Zincum metallicum* 50
4.9. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* e *Zincum metallicum* 52
5. Discussão 56
6. Conclusão 65
7. Conflito de interesses 65
8. Referências 66

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE CORANTES SOLVATOCRÔMICOS COMO MARCADORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS E DE AMOSTRAS DE SOBRENADANTES

O presente estudo tem a finalidade de determinar se corantes solvatocrômicos podem ser utilizados como método de escolha de medicamentos homeopáticos para tratamento de sistemas vivos infectados com diferentes agentes infecciosos. Tal método permite analisar possíveis alterações no momento dipolo da água quando em contato com diluições homeopáticas de diferentes origens. A pesquisa se desenvolveu a partir de sobrenadantes (SNs) colhidos de macrófagos RAW 264.7 estimulados com bacilos *Calmette-Guérin* (BCG) (cepa vacinal) e tratados com *Silicea terra* 6, 30, 200 cH, *Zincum metallicum* 6, 30, 200 cH e controles; desafiados com *Encephalitozoon cuniculi (E. cuniculi)* e tratados com *Phosphorus* 6, 30, 200 cH e controles; ou ainda ativados com LPS (mimetizando infecção por bactérias Gram negativas) e tratados com Aspirina 15 cH e controles. Os SNs descongelados foram diluídos 1:10 em água pura estéril e 1:100 em solução hidro-alcooólica 30%, sendo sucussionados por 100 vezes em braço mecânico automático (Autic®). Os respectivos medicamentos também foram preparados em solução hidro-alcooólica 30% do mesmo lote e sucussionados da mesma forma. Todas as amostras foram codificadas aleatoriamente, em números consecutivos, por um técnico não envolvido com a experimentação. Os códigos só foram quebrados após a análise estatística, de forma que todo o estudo foi realizado em cego. Antes de cada experimento, as amostras foram submetidas a 40 agitações verticais manuais, filtradas em filtro de malha 0.22 micrômetros e adicionadas aos corantes na proporção 1:60. Seis diferentes corantes solvatocrômicos (BDN, NNDMIA, Cumarina, Rodanina, Violeta metileno e Vermelho do Nilo) foram testados, a fim de cobrir todos o espectro de luz visível. A leitura em espectrofotômetro foi feita em cubetas descartáveis e a concentração dos corantes foi definida segundo padrões previamente estabelecidos, utilizando álcool absoluto como solvente. Todas as preparações foram feitas em capela de fluxo laminar e com o mínimo de incidência de luz possível sobre os corantes, até o momento da leitura. As condições ambientais foram controladas diariamente, sendo medidas temperatura, umidade e fluxo magnético. Antes de cada série de medidas, o equipamento foi calibrado com o mesmo álcool absoluto usado na preparação dos corantes e o comprimento de onda correspondente ao pico de absorbância foi registrado. As amostras foram analisadas em triplicata, em três séries experimentais consecutivas (N=9). O perfil de absorbância de cada medicamento foi comparado com a absorbância dos respectivos SNs. O método estatístico usado foi a ANOVA de uma via, seguido de Tukey, sendo os valores de $p<0,05$ considerados significantes. Testes de normalidade foram feitos por Shapiro-Wilk e eventuais *outliers* foram removidos após inspeção do *QQ plot*. Concluiu-se, portanto, que a Rodanina é um bom marcador de solventes submetidos à sucussão, provavelmente em função da atividade oxidativa associada; Cumarina é marcador de *Phosphorus* 6cH e de sobrenadantes tratados com Aspirina 15 cH e LPS; BDN é marcador de *Silicea terra* 6 cH, 30 cH e 200 cH, *Zincum metallicum* 30 cH e 200cH e Aspirina 15cH; Violeta metileno é marcador de sobrenadantes tratados com *Silicea terra* 30 cH e 200cH, bem como *Zincum metallicum* 6 cH e 200cH. Os demais corantes não apresentaram interações específicas com as amostras estudadas.

Palavras-chave: homeopatia, espectrofotometria de luz visível, corantes solvatocrômicos, propriedades físico-químicas, mecanismo de ação.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SOLVATOCHROMIC DYES AS PHYSICOCHEMICAL MARKERS OF HOMEOPATHIC DRUGS AND SUPERNATANTS SAMPLES

The present study aims to determine whether solvatochromic dyes can be used as a method of choice for homeopathic medicines to treat living systems infected with different infectious agents. This method allows analyzing possible changes in the dipole moment of water when in contact with homeopathic dilutions of different origins. The research was developed from supernatants (SNs) collected from RAW 264.7 macrophages stimulated with *bacilli Calmette-Guérin* (BCG) (vaccinal strain) and treated with *Silicea terra* 6, 30, 200 cH, *Zincum metallicum* 6, 30, 200 cH, and controls. Supernatants challenged with *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) and treated with *Phosphorus* 6, 30, and 200 cH and controls, or even from macrophages activated with LPS (mimicking infection by Gram-negative bacteria) treated with Aspirin 15 cH and controls. The thawed SNs were diluted 1:10 in sterile water, then 1:100 in 30% hydro-alcoholic solution and submitted to 100 succussions in a robotic mechanical arm (Autic®). The respective medicines were also prepared in 30% hydro-alcoholic solution from the same batch, being succussed in the same way. All samples were randomly coded in consecutive numbers by a technician not involved in the experiment. The codes were only broken after statistical analysis; thus, the study was performed entirely blind. Before each experiment, the samples were submitted to 40 manual vertical agitations, filtered in a 0.22-micrometer mesh filter, and added to the dyes in a 1:60 ratio. Six different solvatochromic dyes (BDN, NNDMIA, Coumarin, Rhodanine, Methylene Violet, and Nile Red) were tested to cover the whole visible light spectrum. The reading was done in a spectrophotometer in disposable cuvettes, and the concentration of the dyes was defined according to previously established standards, using absolute alcohol as a solvent. All preparations were carried out in a laminar flow hood, with an as little light incidence as possible on the dyes, until the moment of reading. The environmental conditions were controlled daily, being measured temperature, humidity, and magnetic flux. Before each series of measurements, the equipment was calibrated with the same absolute alcohol used in the preparation of the dyes, and the wavelength corresponding to the peak of absorbance was recorded. The samples were analyzed in triplicate, in three consecutive experimental series (N=9). The absorbance profile of each drug was compared with the absorbance of the respective SNs. The statistical method used was one-way ANOVA, followed by Tukey, with $p<0.05$ being considered significant. The Shapiro-Wilk test checked normality, and eventual outliers were removed after inspection of the QQ plot. Therefore, it was concluded that Rodanine is a good marker of solvents subjected to succussion, probably due to its associated oxidative activity; Coumarin is a marker of Phosphorus 6cH and of supernatants treated with Aspirin 15cH and LPS; BDN is a marker of Silicea terra 6 cH, 30 cH and 200 cH, Zincum metallicum 30 cH and 200cH and Aspirin 15cH; Methylene violet is a marker of supernatants treated with Silicea terra 30 cH and 200cH, as well as Zincum metallicum 6 cH and 200cH. The other dyes did not show specific interactions with the samples studied.

Keywords: homeopathy, visible light spectrophotometry, solvatochromic dyes, physicochemical properties, mechanism of action.

1. Introdução e revisão da literatura

Homeopatia

A Homeopatia é uma terapêutica desenvolvida por Sammuel Hahnemann, na Alemanha, no início do século XIX. Hoje, ela é reconhecida como especialidade no Brasil, pelos Conselhos Federais de Medicina, Medicina Veterinária, Farmácia e Odontologia. A metodologia homeopática consiste em administrar ao doente medicamentos preparados em diluições seriadas, sendo cada etapa seguida de 100 sucussões, ou agitações verticais, a partir de uma substância capaz de provocar, em indivíduos sadios e sensíveis, sintomas semelhantes aos apresentados pelo paciente (no caso da substância ativa ser insolúvel, as primeiras etapas são feitas por trituração seriada em lactose). Tal racionalidade é chamada de “princípio de similitude” (BONAMIN, 2016). Os efeitos dos medicamentos homeopáticos estão relacionados, em parte, à modulação de vias de sinalização intracelular (SILVA, 1997; BONAMIN, 2016; MONDAL *et al*., 2016; OLIOSO *et al*., 2014; MARZOTTO *et al*., 2014, 2016; BONAMIN, 2017), mas ainda não se sabe a natureza exata do sinal capaz de modificar tais vias.

A resposta ao tratamento homeopático depende da individualização e da sensibilidade do indivíduo, portanto o mesmo medicamento pode agir de uma forma específica para um indivíduo, enquanto para outro pode ter resposta diversa ou nenhuma resposta, ainda que ambos apresentem as mesmas condições nosológicas (BONAMIN, 2016). A evolução dos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* nos últimos 30 anos contribuiu de maneira significativa para a elucidação de alguns dos mecanismos celulares, aumentando ou inibindo funções celulares específicas, sobretudo em estados patológicos, sempre no sentido de adaptar o sistema vivo aos desafios do microambiente onde se encontram. Tais mecanismos de adaptação estão relacionados em parte ao mecanismo de hormese (CALABRESE, GIORDANO, 2021), mas sempre melhoram o processo de bioresiliência, mesmo quando do tratamento populacional (BONAMIN, BELLAVITE 2015; BONAMIN, 2016, 2017; PAIXÃO et al., 2021; PINTO *et al*., 2021a).

Estudos científicos têm contribuído para elucidação dos mecanismos de ação da homeopatia, ainda incógnitos (BONAMIN *et al*., 2020), bem como para uma abordagem terapêutica mais atualizada (SCHMIDT, 2020). Durante o preparo, os medicamentos homeopáticos são agitados repetida e vigorosamente (BONAMIN, 2016), mas ainda não se sabe qual o papel exato da energia cinética gerada nesse processo sobre a atividade biológica observada (CARTWRIGHT, 2018), uma vez que grande parte das potências (ou diluições) homeopáticas utilizadas na prática clínica ultrapassam o

limite de Avogadro. Porém, por meio de modelos experimentais, pode-se construir um caminho sólido para a elucidação do modo de ação das potências dinamizadas nos diferentes sistemas vivos (WAISSE e BONAMIN, 2019). Entende-se como “dinamizadas” as diluições de um agente ativo submetidas à sucussão.

Diferentes abordagens têm reforçado a precisão e confiabilidade da prescrição homeopática (EIZAYAGA *et al*., 2021; RUTTEN *et al*., 2021), replicadas em estudos *in vivo* ou *in vitro* (ENDLER *et al*., 2010; BONAMIN *et al*., 2020). Por exemplo, experimentos *in vitro* evidenciam alterações físicas e biológicas específicas dos medicamentos, do plano macroscópico ao celular (ENDLER *et al*., 2010; ENDLER *et al*., 2015; BONAMIN *et al*., 2020; VAN WASSENHOVEN *et al*. 2021; PINTO *et al.* 2021b; MATHIE, 2021); pesquisas recentes sobre animais aquáticos tratados com homeopatia têm se mostrado úteis como modelos experimentais com enfoque ambiental (VALENTIM-ZABOTT, 2008; BRACCINI, 2011; MELO, 2020; NAGAI, 2021; PINTO, 2021a).

Hipóteses

Atualmente, duas principais hipóteses são propostas para se explicar os mecanismos de ação de substâncias altamente diluídas e dinamizadas, ou submetidas à sucussão. Uma delas propõe ações de sinalização célula a célula por nano-associados exógenos e endógenos, envolvendo nanopartículas, nanobolhas e *clusters* de água, resultando em uma cascata de eventos biológicos moduladores (BELL, KOITHAN, 2012; BELL *et al*., 2014; DEMANGEAT, 2018; VAN WASSENHOVEN *et al*., 2018; CALABRESE, GIORDANO, 2021). Outra hipótese é a sinalização por propriedades físico-químicas geradas durante o processo de diluição seriada e sucussão (ELIA e NICCOLI, 2004; DEL GIUDICE *et al.,* 2015; FOLETTI *et al.,* 2015; SCHULTE e ENDLER, 2015; CARTWRIGHT 2016, 2017, 2018, 2019; KONAR *et al.,* 2016; MAHATA, 2017; MONTAGNIER *et al*., 2017; YINNON, 2017; KLEIN *et al.* 2018; TOURNIER, 2019; BONAMIN *et al.,* 2020; TOURNIER, 2020). Nesse caso, a substância de partida (soluto) atuaria como uma “assinatura”, definindo padrões de sinalização em relação ao sistema biológico responsivo. Não se pode descartar, contudo, a possibilidade de ambas as propostas coexistirem no processo de sinalização biológica.

Em revisão sistemática recente, concluiu-se que as técnicas mais promissoras usadas até agora para a caracterização físico-química das preparações homeopáticas são a ressonância nuclear magnética (RNM), a espectroscopia óptica e as medições de impedância elétrica (TOURNIER *et al*., 2019). Recentemente, tem-se desenvolvido

sistemas de imageamento a fim de reconhecer o comportamento físico-químico de preparações homeopáticas (ZANCO *et al*, 2021).

Os princípios da eletrodinâmica quântica (QED) proposto por DEL GIUDICE *et al*., 1988, 2015, podem ser entendidos como possível explicação científica para o modelo teórico de "transferência de informação" da substância de partida para a solução aquosa (JERMAN *et al*., 1999; MANZALINI e GALEAZZI, 2019), fato ainda a ser verificado experimentalmente. Nesse contexto, um dos possíveis mecanismos envolvidos seriam eventuais alterações nos momentos de dipolo da água (MAHATA 2013) originados no solvente submetido à agitação, a partir da oscilação de dipolos causados por campo elétrico (MAHATA, 2013; MAITY, MAHATA, 2021).

Corantes solvatocrômicos

Investigações estão sendo realizadas utilizando-se espectrometria de UV/VIS e de fluorescência como ferramentas para observar mudanças nos espectros das sondas cromóforas em função da sucussão, da natureza da substância diluída e de fatores ambientais específicos (CARTWRIGHT, 2018), face a diferentes parâmetros físico-químicos (SAGAR *et al*, 2015). O momento dipolo de uma molécula pode ser maior no estado de excitação, produzindo mudanças no seu espectro de absorção eletrônica (KEMP, GORDON, 2008; BHATTACHARYYA, 2018). Assim, um momento dipolo específico poderia ser gerado em líquidos polares de soluções altamente diluídas e agitadas vigorosamente, formando um campo elétrico rotacional (YINNON, YINNON, 2011).

No caso dos corantes solvatocrômicos em contato com potências homeopáticas, há mudanças na intensidade de cor (REICHARDT e WELTON, 2011; CARTWRIGHT, 2016, 2017; KLYMCHENKO, 2017) por provável modificação de seu momento dipolo, que podem ser mensuradas em um espectrofotômetro (REICHARDT e WELTON, 2011; CARTWRIGHT, 2016, 2017). Os corantes solvatocrômicos constituem uma grande classe de sondas sensíveis ao microambiente líquido e que alteram a cor em resposta à polaridade local (XU *et al*., 2009; KLYMCHENKO, 2017; CARTWRIGHT *In*: BONAMIN, WAISSE, 2019). Sabendo-se que os corantes solvatocrômicos são caracterizados por possuir um grupo de doação de elétrons e um grupo aceptor de elétrons (REICHARDT, 2008), polos positivos e negativos respondem coletivamente, de maneira oposta e complementar às moléculas do solvente onde estão diluídos (CARTWRIGHT, 2019, 2020) assim, estes corantes podem monitorar diretamente quaisquer modificações do microambiente local (KLYMCHENKO, 2017).

A adição de diferentes potências homeopáticas modifica os padrões encontrados nos espectros de absorbância de corantes solvatocrômicos (CARTWRIGHT, 2017). Esse modelo apresentado por Steven Cartwright aponta uma linha de pesquisa mais apurada a respeito da hipótese de campo para entender o comportamento de diluições homeopáticas, salientando que solventes polares atuam como dipolos alternantes elétricos e susceptíveis aos efeitos dos fenômenos de ressonância. Consequentemente, marcadores e medidas espectrofotométricas são ferramentas que podem ser empregadas para identificar tal ressonância (CARTWRIGHT, 2016, 2017, 2019, 2020).

Em 2019, Cartwright demonstrou a magnitude das alterações espectrais induzidas na potência 10 M de *Arsenicum album.* Com isso, pôde-se fazer uma estimativa da força do campo elétrico, sendo este comparável à diferença de potencial existente nas membranas celulares (CARTWRIGHT, 2019), o que reforça a hipótese de sinalização célula-à-célula por meio de nanoestruturas (BELL *et al*., 2014; CALABRESE, GIORDANO, 2021). Em 2021, Nagai observou o papel potencial do corante solvatocrômico Cumarina como um sinalizador físico-químico de valor preditivo para amostras de água tratadas com Glifosato 6cH, o que sugere um aspecto prático importante dessa técnica (NAGAI, 2021). Resultado similar foi observado com o isoterápico de arseniato de sódio 6 cH em resposta ao corante vermelho do Nilo (MELO, 2020).

Desta maneira, torna-se imprescindível formular e testar modelos experimentais utilizando ferramentas químicas e físicas em paralelo às investigações em nível celular e molecular (JERMAN *et al*., 1999; KLEIN *et al*., 2018). Por exemplo, o tratamento *in vivo* com *Antimonium crudum* 30cH induziu um padrão de resposta imune associado à redução do processo inflamatório crônico no sítio primário da infecção por *Leishmania amzonensis* (RODRIGUES DE SANTANA *et al.,* 2014). Posteriormente, resultados obtidos *in vitro* mostraram efeitos moduladores na produção de certas qumiocinas por macrófagos desafiados e tratados com *Antimonium crudum* 30 cH, as quais foram capazes de justificar as alterações prévias observadas no hospedeiro (DE SANTANA *et al.,* 2017). A partir destes resultados, um estudo adicional foi realizado para verificar a existência ou não de interação entre corantes solvatocrômicos e o sobrenadante das células previamente tratadas com *Antimonium crudum* 6cH, 30cH e 200cH. Como resultado, observou-se uma clara correspondência entre os efeitos biológicos do *Antimonium crudum* 30cH e os efeitos físico-químicos revelados pelos corantes solvatocrômicos BDN e ET33 (BONAMIN *et al*., 2020).

O conceito geral de estruturação da água é baseado em várias linhas experimentais, compreendendo que as moléculas de água são capazes de se organizar em interfaces polares para formar uma zona de exclusão (POLLACK, 2013; GUEDES, BONAMIN e CAPELOZZI, 2018; KLEIN *et al*., 2018; SUKUL e SUKUL, 2019), bem como se auto-organizar. Tal fato foi corroborado com a propagação da atividade de *Phos* 30 cH em extensos volumes de água, identificada pelo uso do corante solvatocrômico Violeta de metileno como sonda para o rastreamento de suas propriedades físico-químicas (APARICIO *et al*., 2020a). As propriedades dielétricas da água têm sido evidenciadas por meio de alterações nos padrões de eletro-condutividade do veículo após agitações sucessivas (YINNON, 2011; MAHATA, 2013; ELIA *et al*., 2014; PINTO, 2018; VAN WASSENHOVEN *et al*., 2018; DALBONI *et al*., 2019). Postula-se, entretanto, que os possíveis fenômenos da "*bioinformação da água"* estejam relacionados a oscilações de campos eletromagnéticos (YINNON, YINNON, 2011; VERDEL *et al*., 2012; ELIA *et al*., 2014; SMITH, 2015). Sinais eletromagnéticos de baixa frequência (EMS) podem ser emitidos por soluções aquosas diluídas de DNA bacterianos e virais (MONTAGNIER, 2015).

Variações na polaridade dos solventes submetidos à sucussão podem interferir na condutividade dos mesmos (DOUGHERTY e HOWARD, 1998) e modificar as interações intermoleculares entre o solvente e o corante (BHATTACHARYYA, 2018) por oscilações dipolares do campo elétrico (MAHATA, 2013). Mais de 60 corantes solvatocrômicos já foram investigados em relação às alterações espectroscópicas induzidas por potências homeopáticas (CARTWRIGHT, 2016, 2017; 2018; 2019; MOTA, 2018).

Como consequência, um número crescente de particularidades tem sido descrito sobre o modo de ação desses corantes. A exposição dos medicamentos a correntes elétricas fracas anula tais efeitos (BONAMIN *et al*., 2020), visto que corantes solvatocrômicos também são eletrocrômicos (XU *et al*, 2009; CALLIS, 2010). Os corantes solvatocrômicos apresentam sensibilidade à polaridade e, por esse motivo, têm sido aplicados com sucesso em membranas biológicas para estudar domínios lipídicos, apoptose e endocitose. São importantes marcadores fluorescentes podendo detectar praticamente qualquer tipo de interação biomolecular, envolvendo proteínas, ácidos nucléicos e biomembranas. Futuramente, o desenvolvimento de sondas fluorescentes menos sensíveis ao ambiente deve minimizar interações inespecíficas dessas sondas em sistemas biológicos (KLYMCHENKO, 2017). Amostras citológicas hepáticas coradas com rodanina, um corante solvatocrômico, demonstram um potencial diagnóstico aceitável

para a detecção de conteúdo de cobre (MOORE *et al*., 2016), a rodanina também pode ser utilizada como marcador de células de carcinoma de fígado humano e mama MCF-7 em estudos espectrais (KRITHIKA *et al.*, 2021; ANUMALA *et al*., 2013), possivelmente por mudanças nos grupos de ligação de oxigênio e prótons. Derivados deste corante têm sido utilizados em estudos sobre doença de Alzheimer (ONO *et al*., 2010; ANUMALA *et al*., 2013).

Outros modelos físico-químicos

Além da solvatocromia, a análise de micro e nanopartículas presentes em medicamentos homeopáticos por meio de microscopia eletrônica de varredura também é um método que permite caracterizar algumas particularidades das potências homeopáticas. No caso da *Silicea terra* e do *Zincum metálico,* ambos na potência 200cH, observou-se um denso agrupamento de micropartículas, o que não ocorreu nas demais potências estudadas, nem tampouco na água pura (PINTO, 2018). Efeito similar foi observado por Van Wassenhoven *et al*., 2018, indicando que tais preparações mobilizam a reorganização dessas estruturas em suspensão, inicialmente presentes como partículas menores (PINTO, 2018; BELL e KOITHAN, 2012).

Outros estudos sistemáticos confirmam que líquidos polares submetidos à agitação forte produzem nanobolhas (NBs) (WADA, NAKANO e SATO, 2014; DEMANGEAT, 2015, 2018)**.** As ultradiluições podem conter muito mais moléculas do que o esperado, em especial, como formas nanoparticuladas que geram superestruturas associadas ao soluto, às nanobolhas e ao próprio solvente. Tais superestruturas não são observadas em soluções não dinamizadas e nem em baixas diluições (DEMANGEAT, 2018)**.**

Os medicamentos homeopáticos respondem por meio de mecanismos específicos de adaptação e amplificação dos sinais biológicos (BELL e KOITHAN, 2012; BELL e SCHWARTZ, 2013). A respeito deste fato, alguns autores sugerem a atualização da terminologia “homeopatia” para “nanomedicina de cadeia adaptativa”. Nanobolhas (NBs) têm sido objeto de estudos devido às suas características peculiares, incluindo flutuabilidade extremamente baixa, longevidade, alta solubilidade de oxigênio, aumento do potencial zeta e explosão durante o colapso, portanto, a formação dos NBs durante a preparação de diluições homeopáticas, ainda que sob pressão atmosférica, não pode ser ignorada (TAKAHASHI *et al*., 2007; AGARWALL *et al*., 2011; DEMANGEAT, 2015).

Considera-se, ainda, a ideia de que mecanismos de ressonância elétrica também poderiam resultar na reorganização de micro e nanoestruturas presentes no

solvente polar, formando micro e nanoassociados, os quais, hipoteticamente, poderiam atuar em certas vias de sinalização intracelular (ULLMAN, 2021). Eis uma teoria unificada, digna de ser investigada.

Modelos biológicos

Sob o ponto de vista biológico, a literatura mostra variações na atividade oxidativa após o tratamento de macrófagos com diversos medicamentos homeopáticos (CAVALARO *et al*., 2017; PINTO, 2018; DALBONI *et al*., 2019). Resultados prévios mostraram que medicamentos homeopáticos apresentam efeitos moduladores da atividade de macrófagos RAW 264.7 infectados com BCG *in vitro*, como maior fagocitose de bacilos e maior atividade lisossômica. Sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com BCG e tratados com *Silicea terra* 200cH, por exemplo, apresentaram redução significativa da concentração de H_2O_2, bem como aumento da produção de IL-10 (PINTO *et al*., 2021b). Por outro lado, a expressão de CD54 em macrófagos foi aumentada por *Zincum metallicum* 5 cH (GONÇALVES *et al*., 2017). Tais efeitos estão provavelmente relacionados à modulação de vias de sinalização intracelular (SILVA, 1997; MARZOTTO *et al*., 2014; OLIOSO *et al*., 2014; BONAMIN, 2016; MONDAL *et al*., 2016; BONAMIN, 2017).

A Aspirina 15 cH também induziu aumento de H_2O_2 concomitante à ativação macrofágica (*spreading*), efeito semelhante àquele provocado pelo LPS (VON ANCKEN, 2020). Em outro estudo, *Phosphorus* 200 cH também produziu ação reguladora da atividade de macrófagos RAW 264.7 infectados com *E. cuniculi*, com aumento específico, progressivo e tempo-dependente da quimiocina RANTES, essencial no prognóstico desta infecção em humanos imunossuprimidos (NAGAI *et al*., 2019).

Os dados tomados em conjunto mostram que macrófagos são particularmente sensíveis aos efeitos das altas diluições (OLIVEIRA *et al*., 2011; SIQUEIRA *et al*., 2013; RODRIGUES DE SANTANA *et al.,* 2014; OLIOSO *et al*., 2016; DE SANTANA *et al*., 2017; GONÇALVES *et al*., 2017; NASCIMENTO *et al*., 2017; PINTO, 2018; DALBONI *et al*., 2019; NAGAI *et al*., 2019; PINTO *et al*., 2021b), por esse motivo foram escolhidos no presente estudo como modelo biológico de base para a seleção de amostras a serem testadas quanto à interação com corantes solvatocrômicos.

Justificativa

Propõe-se, portanto, um modelo experimental que possa apontar se corantes solvatocrômicos podem ser utilizados como método exequível e de baixo custo na

escolha de medicamentos homeopáticos em diferentes situações, ou ainda como “marcadores eletrônicos” de sua atividade. Para isso, buscou-se identificar eventuais correspondências entre a interação dos corantes com medicamentos específicos e a interação com amostras biológicas (sobrenadantes) obtidas de culturas de macrófagos tratados previamente com os mesmos medicamentos.

A escolha de amostras congeladas obtidas de estudos já finalizados foi priorizada em detrimento do uso de amostras cujos experimentos ainda estão em andamento. Tal fato se deve à constatação da preservação das propriedades físicas dos insumos dinamizados mesmo após longos períodos de congelamento (MONTAGNIER *et al*., 2015; BONAMIN *et al*., 2020), o que representa grande vantagem metodológica. Também será possível comparar os resultados obtidos na interação das amostras com os corantes solvatocrômicos com os efeitos biológicos previamente estabelecidos a partir das mesmas amostras, cujos resultados já tenham sido revisados por pares e publicados. Isso permite atribuir maior confiabilidade aos resultados, além de consumir menos recursos financeiros.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar se corantes solvatocrômicos podem ser usados como método de escolha de medicamentos homeopáticos em diferentes situações, ou como marcador físico-químico da atividade desses medicamentos.

2.2. Objetivos Específicos

a) Avaliar, pelo método de Cartwright, a interação entre medicamentos homeopáticos, ou amostras de sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 infectados e tratadas com tais medicamentos e os seguintes corantes solvatocrômicos: (+)4-(BIS-(4-(DIMETYLAMINE) FENYL) METHYLENE)-1(4H)-NAPHTALENONE) **(BDN),** Methylene violet **(VM ou Violeta metileno)**, *Coumarin* 7 **(Cumarina),** 5-(4–DIMETILAMINEBENZYLIDENE) *Rhodanine* **(Rodanina)**, *Nile red* **(Vermelho do Nilo)** e N, N-DIMETHYLINDOANILINE **(NNDMIA).**

b) Estabelecer possíveis correspondências entre os medicamentos e as respectivas amostras biológicas quanto à interação com corantes solvatocrômicos específicos.

3. Métodos

3.1. Ética

Neste estudo foram usados sobrenadantes de macrófagos da linhagem RAW 264.7 congelados e provenientes de estudos anteriores, portanto a aprovação do comitê de ética da UNIP para uso de animais em pesquisa não foi necessária.

Declara-se, portanto, que este projeto não envolve o uso de animais.

3.2. Padronização do método e desenho experimental

Escolha das amostras

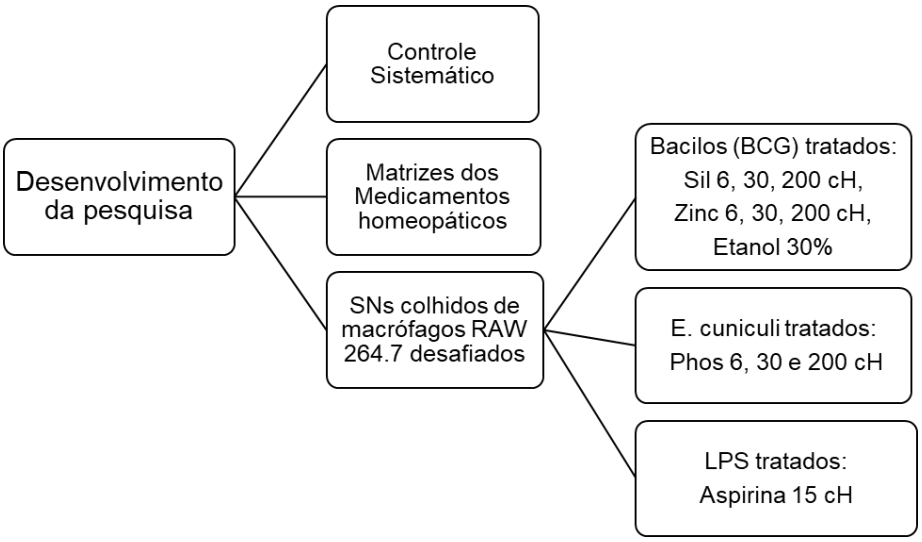
O estudo foi dividido em dois períodos. O primeiro período foi dedicado à padronização do método em cada um dos passos. O segundo período foi dedicado à realização de uma série de experimentos, seguindo rigorosamente o método padronizado. Além da sistematização do método de preparo das amostras, foram também padronizadas a dupla checagem e a validação do comprimento de onda e absorbância do pico de cada corante estudado, evitando vieses de leitura.

Antes do início da avaliação das amostras propriamente ditas, foi realizada uma avaliação prévia para a identificação de possíveis interações entre corantes e os veículos dinamizados, a fim de se conhecer possíveis respostas inespecíficas. Dessa forma, a primeira análise comparativa entre os corantes foi feita com o assim chamado “controle sistemático”.

Foram utilizadas amostras congeladas que apresentaram efeitos biológicos significativos em resposta aos tratamentos com medicamentos homeopáticos após desafio com microorganismos (*Mycobacterium tuberculosis* da capa vacinal e *Encephalitozoon cuniculi*) ou com LPS (lipopolissacarídeo). Tais amostras foram provenientes de experimentos anteriores realizados em cultura celular, em que se utilizou o macrófago RAW-264-7 como modelo biológico.

Em suma, amostras de sobrenadantes e dos respectivos medicamentos utilizados foram selecionadas a partir dos seguintes estudos: 1) Von Ancken (2021), em que o tratamento das culturas de macrófagos RAW 264.7 com Aspirina 15cH aumentou o *spreading* e a expressão de H_2O_2 na mesma magnitude que o LPS. Um efeito paradoxal também foi observado, de forma que a associação entre Aspirina 15cH e LPS resultasse na anulação dos efeitos de ambos, corroborando estudos anteriores realizados com esse mesmo insumo em modelo de trombose (DOUTREMEPUICH *et al*., 2012; EIZAYAGA *et al*., 2019); 2) Nagai *et al* (2019), em que a ação moduladora de *Phosphorus* 200 cH foi observada sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 infectados com *E. cuniculi*, especialmente no que diz respeito ao aumento de RANTES, uma quimiocina chave no prognóstico de paciente imunossuprimidos infectados por esse fungo; 3) PINTO *et al* (2021b), em que os insumos dinamizados *Silicea terra* e *Zincum metallicum* apresentaram diferentes padrões de efeitos em função da diluição (ou potência) utilizada sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 desafiados com BCG (Bacilo Calmette-Guèrin). Uma proporção equilibrada entre IL-6 / IL-10 foi associada ao tratamento das culturas com *Silicea terra* 6cH. A diminuição do estresse oxidativo associada ao aumento da atividade lisossomal foi relacionada ao tratamento com *Silicea terra* 200cH. A fagocitose dependente da potência foi relacionada apenas ao zinco dinamizado.

Um fluxograma geral dos experimentos está representado abaixo:



Fluxograma dos ensaios experimentais

As amostras de sobrenadantes (SNs) foram congeladas em freezer -80ºC desde a sua colheita até seu processamento, conforme descrito abaixo. As amostras de medicamentos foram as mesmas utilizadas nos ensaios biológicos, inclusive os respectivos veículos e controles. São elas:

Amostras de medicamentos

1) Amostras da Farmácia de manipulação HN CRISTIANO (São Paulo, Brasil) - foram avaliados os medicamentos: Aspirina 15cH e etanol 30% (controle). Também foi utilizado, no estudo original, um frasco de Aspirina 15 cH EF (*Electric Flow*), isto é, uma alíquota do medicamento foi submetida à corrente elétrica de baixa amperagem (10 pulsos de 3 segundos a 30 µA), para observar se perturbações na polaridade das moléculas de água desse medicamento pudessem modificar os resultados biológicos.

2) Amostras da Farmácia de manipulação DHERMUS (Londrina, Brasil) - foram avaliados os seguintes medicamentos: *Phosphorus* 5 cH, 29 cH e 199 cH; sendo o controle etanol 30%.

3) Amostras da Farmácia de manipulação SENSITIVA (São Paulo, Brasil) - foram avaliados o etanol 30% (controle) e os medicamentos *Silicea terra* 5 cH, 29 cH, 199 cH e *Zincum metallicum* 5 cH, 29 cH e 199 cH.

Observação: Os veículos utilizados em cada experimento corresponderam aos mesmos lotes usados em cada farmácia, respectivamente, para a produção dos medicamentos em questão.

Amostras de sobrenadantes

1) Amostras de SNs colhidos de macrófagos RAW 264.7 desafiados com BCG - bacilo *Calmette-Guérin* (cepa vacinal de *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch) - foram analisados sobrenadantes tratados com água pura estéril; água pura estéril sucussionada; álcool 0.03% sucussionado; *Silicea terra* 6 cH, 30 cH, 200 cH; *Zincum metallicum* 6 cH, 30 cH, 200 cH e sobrenadantes desafiados e não tratados (MO + BCG). Os dados deste ensaio estão descritos em Pinto *et al*. (2021b).

2) Amostras de SNs de macrófagos RAW 264.7 desafiados com *Encephalitozoon cuniculi* tratados com: água sucussionada; *Phosphorus* 6 cH, 30 cH e 200 cH e álcool 0.03% sucussionado, além de SNs de macrófagos não desafiados e não tratados e SNs de macrófagos desafiados e não tratados, por 1 e 24 horas. As amostras de SNs desse estudo foram cedidas gentilmente pelo autor (NAGAI *et al*., 2019) para elaboração das análises.

3) Amostras de SNs de macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS (Lipopolissacarídeo) 1 µg/ml e tratados com Aspirina 15 cH; Aspirina 15cH-EF; água pura estéril, água pura estéril sucussionada e Aspirina 200 µg/ml. Nesse caso, para melhor interpretação dos dados, os resultados dos diferentes tratamentos foram apresentados em dois conjuntos, sendo o primeiro, chamado de "controle sistemático - Aspirina", composto de sobrenadantes tratados com água sucussionada, com LPS diluído em água não sucussionada e com a associação de ambos (LPS e água sucussionada). A comparação entre eles foi importante para evidenciar possíveis efeitos inespecíficos dessas soluções. O segundo conjunto de dados correspondeu aos tratamentos propriamente ditos. Todas as amostras de sobrenadantes desse estudo foram gentilmente disponibilizadas pelo autor, VON ANCKEN, 2021.

4) Amostras do controle sistemático do presente ensaio: água pura estéril, água pura estéril sucussionada, etanol 0,03% e etanol 0,03% sucussionado.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata, em três séries consecutivas, resultando na preparação de 147 cubetas por corante, por série.

Escolha das cubetas

Antes de iniciar o experimento propriamente dito, foi elaborado um estudo piloto para se definir o melhor padrão de cubetas a ser adotado em todas as séries de análises. Uma comparação entre diferentes tipos de cubetas foi realizada, levando-se em conta cubetas originais descartáveis de 1,5 ml (Cralplast, Cotia, Brazil) (sem pigmentação nas bordas), cubetas pigmentadas nas bordas com esmalte preto fosco e cubetas pigmentadas nas bordas com caneta preta permanente. Tal triagem foi necessária para se verificar possíveis formas de otimizar a transmissão da luz pelo meio líquido, de forma a se obter o máximo de magnificação nas variações de absorbância, uma vez que o método a ser utilizado requer alta sensibilidade na leitura das amostras.

Esse ensaio preliminar foi realizado com dois corantes distintos, cobrindo diferentes faixas do espectro de luz visível: Rodanina e BDN. Os dados desse teste piloto estão expressos nas **Figuras 1 e 2**, no item 4.1 (Resultados). As cubetas originais, sem nenhuma pigmentação, foram escolhidas para a continuação dos ensaios.

3.3. Preparação das amostras para análise

As matrizes dos medicamentos analisados foram manipuladas em farmácias credenciadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) segundo técnica prevista na Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição (BRASIL, 2011), utilizando recipiente de vidro âmbar convencional tipo 2, de 30 ml, para dispensação de medicamentos e etanol 30% (v/v) como veículo, conforme descrito no item 3.2.

Na etapa seguinte, as análises com os corantes foram feitas no mesmo tipo de frasco, todos recém adquiridos e previamente autoclavados. Estes cuidados foram tomados para garantir a homogeneidade das amostras. Dessa forma, a última etapa de dinamização dos medicamentos foi preparada no próprio laboratório de pesquisa a partir das matrizes comerciais listadas no item 3.2. Uma primeira diluição a 10% de cada medicamento (matriz) a ser testado foi feita em água pura estéril, em fluxo laminar. Em seguida, cada amostra foi previamente filtrada em filtro de malha 0,22µm (Millipore®, USA) e diluída na proporção 1:100 em etanol 30% (HN Cristiano, São Paulo, Brasil), sendo imediatamente submetida ao processo de sucussão automática em braço mecânico (AUTIC®, BRASIL), onde foram aplicadas 100 sucussões. O volume de 2/3 de cada frasco foi ocupado com o líquido, para permitir a movimentação do mesmo durante as sucussões, conforme recomendado pela normativa brasileira (BRASIL, 2011). Os batoques e todo o material de consumo não autoclavável foram limpos com álcool 70% e deixados no fluxo sob luz UV por 15 min antes da manipulação.

O mesmo procedimento foi feito para as amostras de sobrenadante. No final do procedimento as amostras remanescentes dos sobrenadantes foram reservadas em freezer -20ºC para eventual utilização posterior. O método de preparo foi padronizado dessa forma para que fossem produzidas amostras permanentes (com prazo de validade de dois anos) a serem empregadas ao longo dos experimentos, sem necessidade de se utilizar novas matrizes. Ao final do preparo, todos os frascos foram encaminhados para codificação.

3.4. Codificação dos frascos

As etiquetas de todos os frascos foram trocadas por funcionário do laboratório não envolvido no experimento antes do início do estudo. As etiquetas originais e os respectivos códigos foram mantidos em envelope lacrado durante todo o ensaio. Dessa forma, todos os experimentos foram realizados em cego e o envelope só foi aberto após o término da análise estatística.

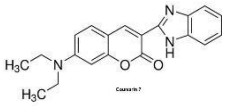
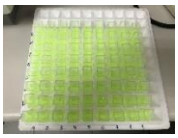
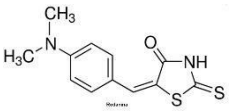
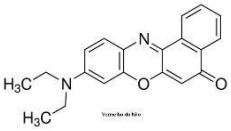
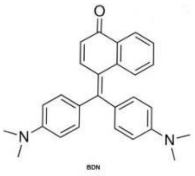
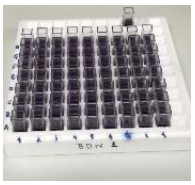
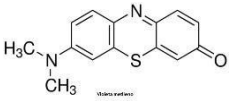
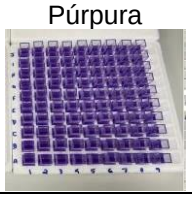
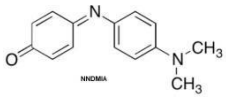
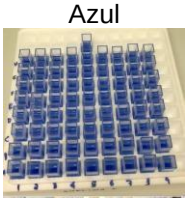
Todas as amostras foram devidamente envelopadas em papel alumínio e duas etiquetas com códigos foram cuidadosamente colocadas, sendo uma diretamente sobre o frasco e outra sobre o papel alumínio. Assim, o mesmo código ficou disponível internamente e externamente à embalagem. O envelopamento com papel alumínio permitiu maior estabilidade do material frente a campos eletromagnéticos e incidência de luz que pudessem estar presentes durante o deslocamento dos frascos. Os frascos codificados foram acomodados em bandejas de isopor elaboradas exclusivamente para esse fim e todas as bandejas foram acondicionados em recipiente com isolamento térmico.

3.5. Espectrofotometria com corantes solvatocrômicos

O método utilizado foi descrito por Steven J. Cartwright (CARTWRIGHT, 2016; 2017; 2018; 2020) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Extração – Campus Paulista, UNIP. Os equipamentos necessários para realizar essa parte do estudo foram: fluxo laminar, espectrofotômetro com sensibilidade de até 3 casas depois da vírgula e com varredura de, no mínimo, 1 nanômetro (FEMTO 800 XI®, São Paulo, Brasil), balança de precisão para a pesagem dos corantes (METTLER – Toledo Monobloc Classic Balance Line AB204-S*,* Greifensee, Suíça), termo-higrômetro DC103 (JIAXI, China) e gaussímetro (SMART-SENSOR INTEL INSTRUMENTS AS 1392, Singapore).

Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar. Os corantes foram preparados na véspera do ensaio para a devida estabilização, obedecendo métodos e concentrações descritas por Cartwright (CARTWRIGHT, 2016; 2017; 2018). Os corantes utilizados estão listados no **Quadro 1**. Imediatamente antes das leituras, os corantes foram filtrados em filtro de malha 0,22µm (Millipore®, USA), em fluxo laminar, bem como as amostras previamente preparadas e etiquetadas, sendo essas últimas submetidas a 30 sucussões manuais imediatamente antes da sua adição aos corantes. Todas as amostras e os corantes foram mantidos em frasco âmbar, embalados em papel alumínio para total proteção da luz e estocados em ambiente livre de campo magnético. O comprimento de onda utilizado para as leituras foi determinado pela varredura entre 350 e 800 nm de cada corante na concentração indicada (**Quadro 1**), para identificação do pico de absorbância. Anteriormente à cada leitura, o equipamento foi calibrado com o controle branco, etanol PA (Synth, Diadema, Brasil). As amostras foram analisadas em triplicata, na proporção 1:60 (amostra:corante). Todo o procedimento foi feito sem intervalos, para evitar a evaporação do álcool antes das medidas e todos os dados foram duplamente checados.

Quadro 1. Corantes padronizados para uso neste experimento e suas características obtidas logo após o preparo.

Corante	Estrutura Química	Cor em álcool puro	Molaridade	Comprimento de onda em álcool puro (a fresco)
CUMARINA 3-(2-BENZIMIDAZOLYL)-7-(DIETHYLAMINO)COUMARIN **CAS Number 27425-55-4** $C_{20}H_{19}N_3O_2$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/416541)	Verde/amarelo fluorescente 	25 µM	**436 nm**
RODANINA (RHODANINE) 5-(4-DIMETHYLAMINOBENZYLIDENE)RHODANINE **CAS Number: 536-17-4** $C_{12}H_{12}N_2OS_2$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/114588)	Amarelo 	50 µM	**451 nm**
VERMELHO DO NILO (NILE RED) NILE BLUE A OXAZONE **CAS Number: 7385-67-3** $C_{20}H_{18}N_2O_2$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/19123)	PINK 	20 µM	**547 nm**
BDN (+) 4-(BIS-(4-(DIMETILAMINO) FENIL) METILENO) -1(4H) -NAFTALENONE **CAS Number: não disponível** $C_{27}H_{26}N_2O$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/19123)	Roxo / azul 	80 µM	**529 nm**
VIOLETA METILENO (+) **(VM)** METHYLENE VIOLET (BERNTHSEN) **CAS Number: 2516-05-4** $C_{14}H_{12}N_2OS$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/s873705)	Púrpura 	50 µM	**592 nm**
N, N-DIMETHYLINDOANILINE **(NNDMIA)** 4-[[4-(Dimethylamino) phenyl]imino]-2,5-cyclohexadien-1-one **CAS Number: 2150-58-5** $C_{14}H_{14}N_2O$	 (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/216313)	Azul 	25 µM	**605 nm**

Três séries de cada análise foram realizadas em dias consecutivos. A cada série, uma nova varredura do corante puro foi executada. Assim, as pequenas variações de absorbância esperadas entre as séries foram normalizadas pelo “delta” (absorbância do corante puro menos absorbância de cada amostra da mesma série experimental) (**Quadros 2 e 3**).

Toda manipulação de corantes e amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar, protegidas da luz, sendo as condições ambientais no interior da capela monitoradas quanto à temperatura, umidade e fluxo magnético. Todos os parâmetros permaneceram estáveis durante todas as séries experimentais, sendo a temperatura média igual a 24,43ºC ± 1,29; a umidade média igual a 51,28% ± 3,85 (Termo-higrômetro DC103, JIAXI, China) e o fluxo magnético igual a 0,18 µT ± 0,05 (Gaussímetro SMART-SENSOR INTEL INSTRUMENTS AS 1392, Singapore).

Sobre a leitura da absorbância e sua interpretação, é **importante ressaltar que as oscilações para mais ou para menos na absorbância não refletem nenhum aspecto quantitativo, mas qualitativo,** pois não se aplicam à mensuração de substâncias, mas revelam mudanças sutis nas propriedades dipolo do próprio solvente, as quais induzem mudanças no rearranjo das moléculas do corante, implicando em maior ou menor absorbância em função do tipo de amostra testada.

Quadro 2. Comprimento de onda (nanômetros) correspondente ao pico de absorbância de cada corante em cada uma das séries experimentais.

Corante	COUMARINA	RODANINA	RED NILE	VM	NNDMIA	BDN
Série 1A	430	446	545	596	602	480
Série 2A	432	448	539	599	604	482
Série 3A	434	443	546	596	605	485
Mediana	**432**	**446**	**545**	**596**	**604**	**482**
Série 1B	435	449	454	561	599	524
Série 2B	433	452	551	599	604	495
Série 3B	434	451	550	601	602	578
Mediana	**434**	**451**	**551**	**599**	**602**	**524**

Quadro 3. Absorbância (densidade óptica) correspondente ao pico de absorbância de cada corante em cada uma das séries experimentais.

Corante	COUMARINA	RODANINA	RED NILE	VM	NNDMIA	BDN
Série 1A	0,497	0,613	0,459	0,539	0,245	0,647
Série 2A	0,577	0,605	0,475	0,557	0,316	0,639
Série 3A	0,507	0,605	0,422	0,559	0,240	0,652
Mediana	**0,507**	**0,605**	**0,459**	**0,557**	**0,245**	**0,647**
Série 1B	0,289	0,492	0,199	0,498	0,203	0,444
Série 2B	0,336	0,553	0,239	0,432	0,195	0,502
Série 3B	0,406	0,498	0,249	0,436	0,256	0,261
Mediana	**0,336**	**0,498**	**0,239**	**0,436**	**0,203**	**0,444**

3.6. Análise Estatística

Os valores lançados na análise foram normalizados pelo “delta”, ou seja, corresponderam aos valores de cada absorbância lida para o corante puro subtraída da absorbância lida para cada amostra na mesma série experimental. Os resultados mostrados nos gráficos foram apresentados como média ± 95% do intervalo de confiança. A significância entre os valores foi analisada por ANOVA de um fator, sendo os resultados expressos em valor de F seguido do universo de determinações independentes expressos em graus de liberdade (entre os grupos; dentro dos grupos). O teste de Tukey foi utilizado como pós-teste nos casos de significância que, em todos os casos, foi fixado em $\alpha = 0,05$. Antes da execução da análise de variância, a normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em caso de não normalidade entre os grupos, fez-se a remoção de outliers pelo método de inspeção do QQ plot, seguindo os critérios de Tukey. Foi utilizado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis para testar as amostras, quando necessário. A análise estatística e os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism 8.3.

4. Resultados

4.1. Análise preliminar dos padrões de cubetas

As cubetas originais, sem pigmentação, demonstraram menor variação e, portanto, maior precisão nos dados. Os dados estão representados nas **Figuras 1 e 2**.

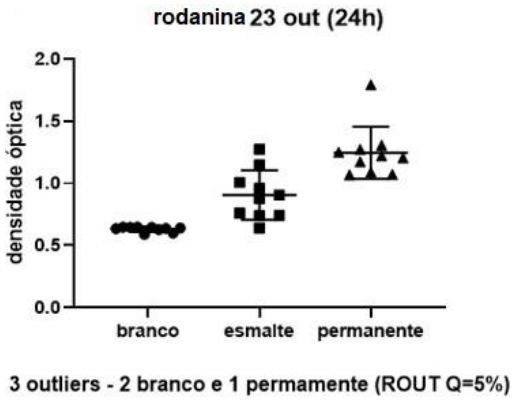


Figura 1. Teste piloto para seleção de cubetas, classificadas como "branco", "esmalte" e "permanente" em relação à absorbância do corante Rodanina. Os valores representam dez repetições, sendo média ± intervalo de confiança de 95%. Outliers foram retirados de acordo com ANOVA de uma via seguida de Tukey ($F_{(2, 24)} = 36,00$; $p < 0,0001$).

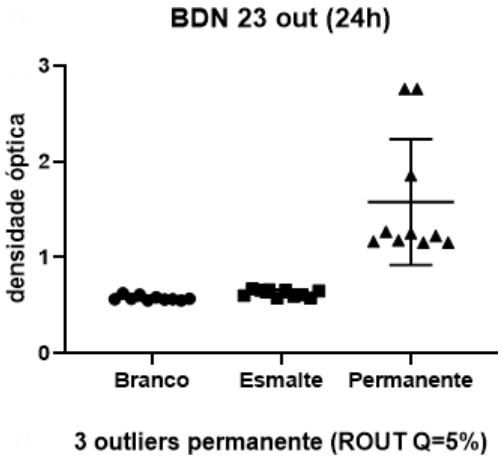
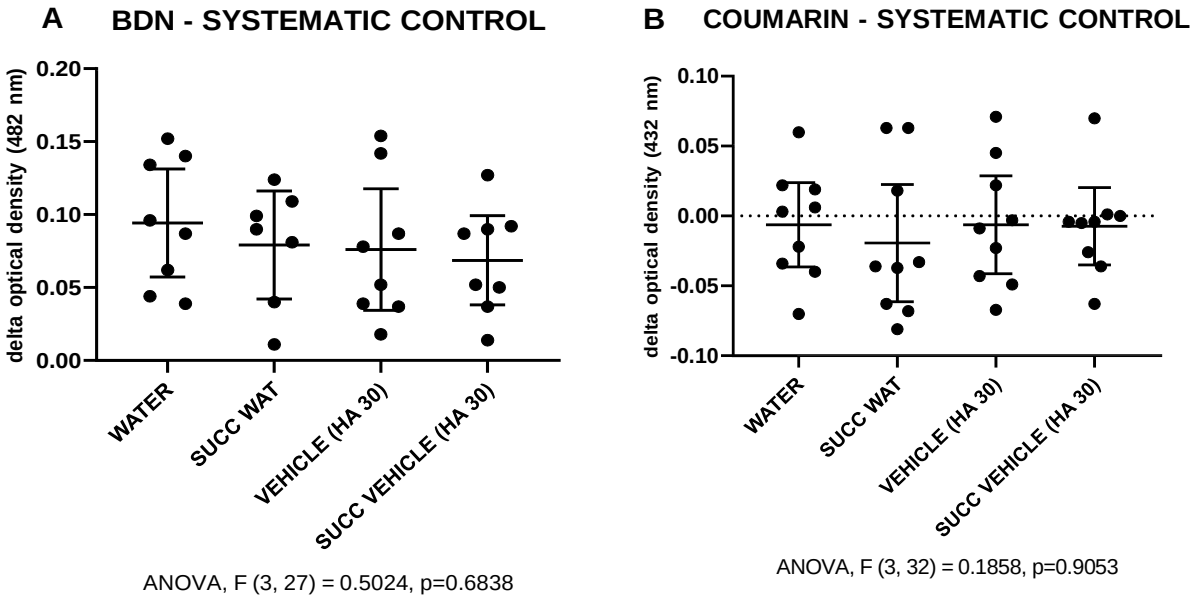


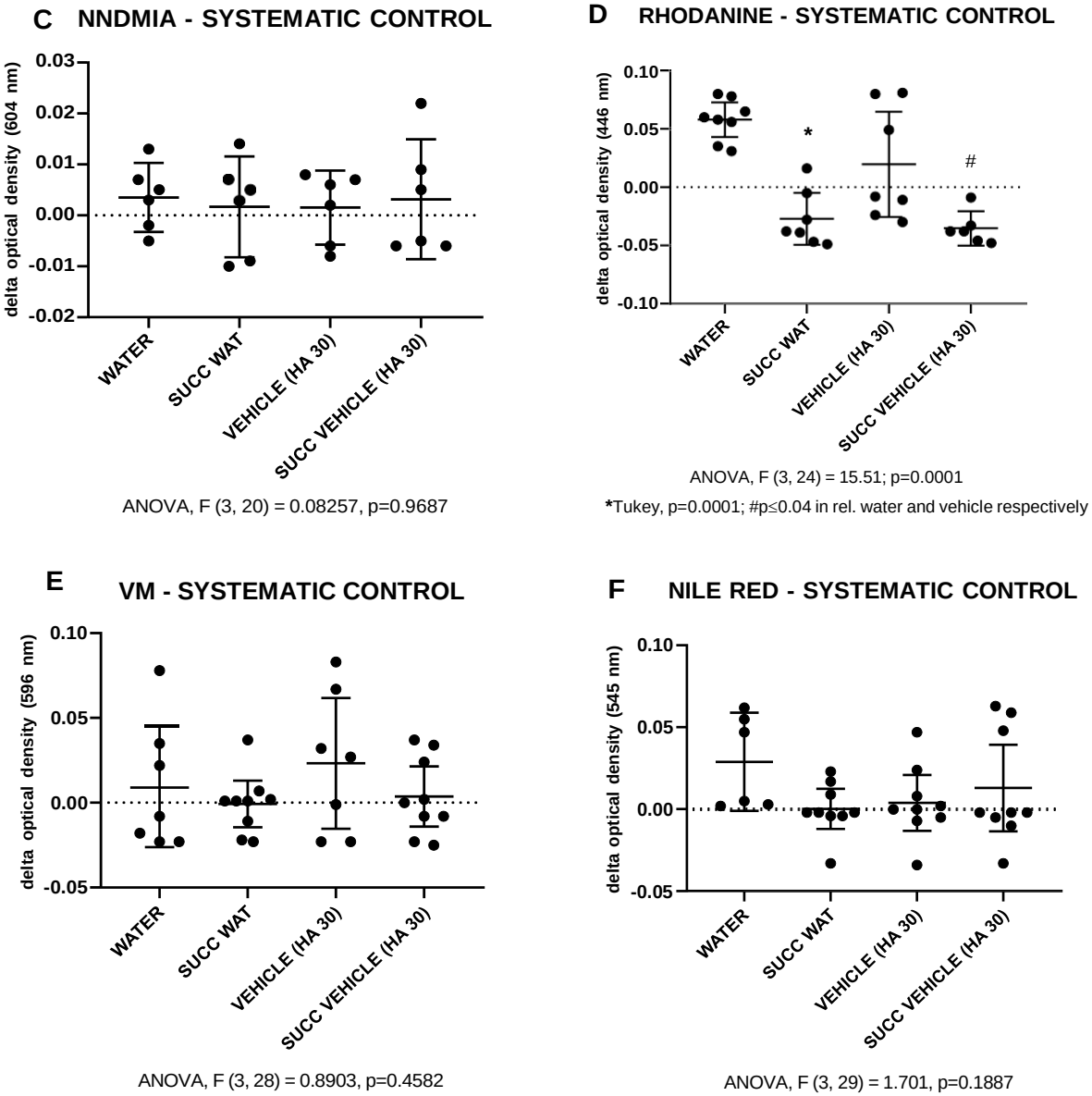
Figura 2. Teste piloto para seleção de cubetas, classificadas como "branco", "esmalte" e "permanente" em relação à absorbância do corante BDN. Os valores representam dez repetições, sendo média ± intervalo de confiança de 95%. Outliers foram retirados de acordo com o método ROUT, sendo Q=5%. ANOVA de uma via seguida de Tukey ($F_{(2, 24)} = 696,3$, $p < 0,0001$).

4.2. Controle sistemático

O corante Rodanina demonstrou ser um marcador específico de amostras sucussionadas. A água sucussionada e o veículo sucussionado interagiram, ambos, com esse corante, apresentando diminuição da absorbância relativa em comparação à água e veículo não sucussionados (**Figura 2 - D**).

Figura 2. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação do controle sistemático. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; WATER = água; SUCC WAT = água sucussionada; VEHICLE (HA 30) = veículo (solução hidro-alcoólica 30%); SUCC VEHICLE (HÁ 30) = veículo (solução hidro-alcoólica 30%) sucussionado. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.



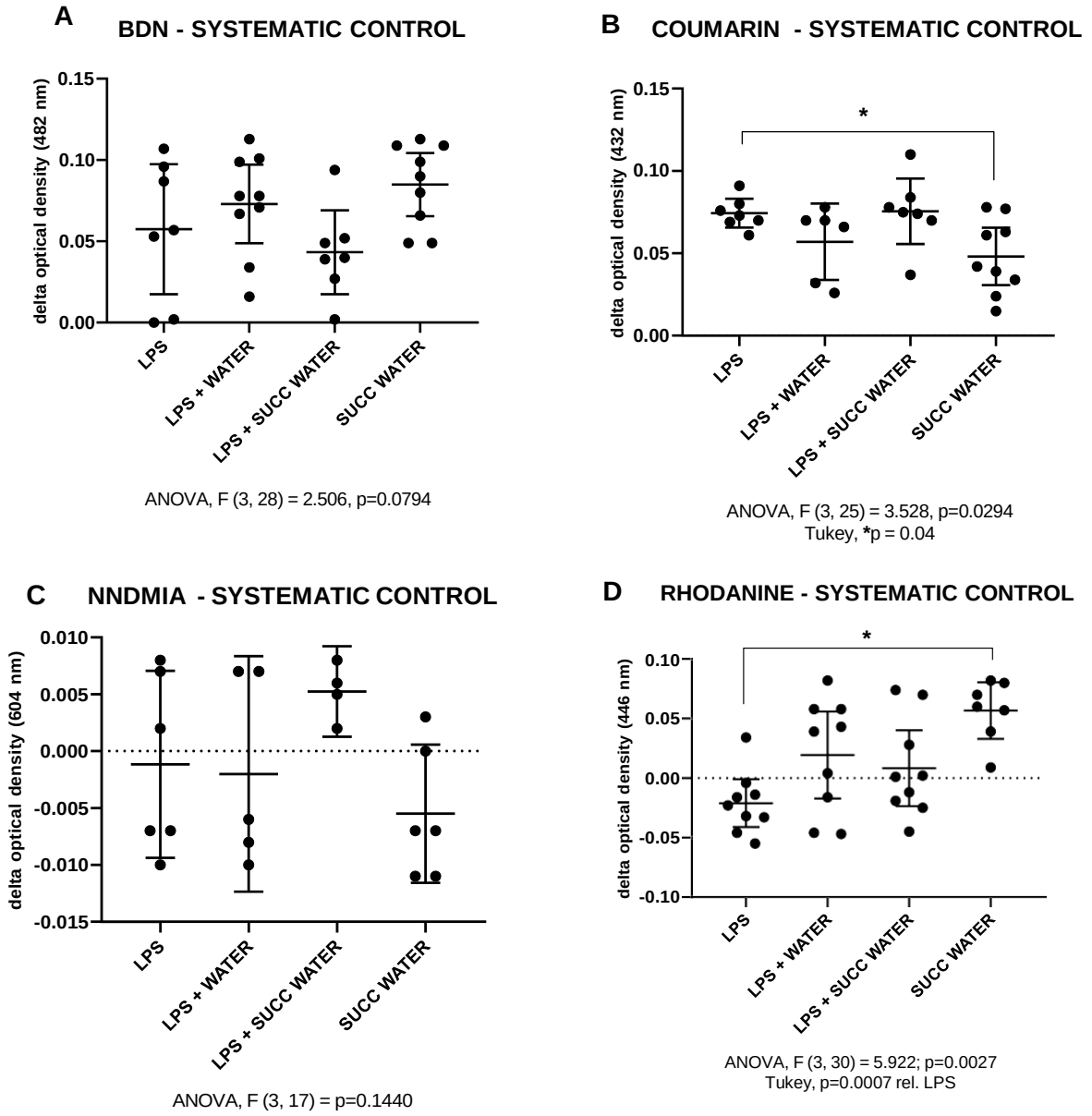


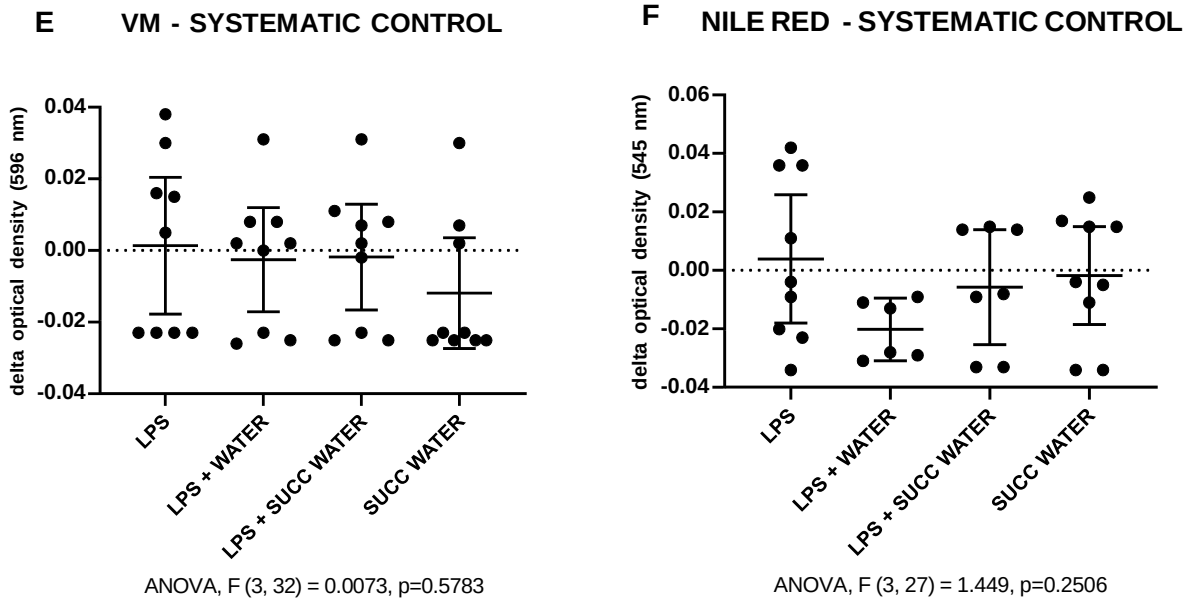
4.3. Aspirina 15cH e sobrenadantes de macrófagos tratados com Aspirina 15cH, desafiados ou não com LPS

Controle Sistemático – Aspirina 15cH

Ambos os corantes, Rodanina e Cumarina mostraram variações significantes entre as absorbâncias relativas das amostras de SNs tratados com LPS e com água sucussionada. As amostras de sobrenadantes tratadas com LPS e água ou LPS e água sucussionada mostraram padrões intermediários, sem significância estatística (**Figura 3 – B/D**).

Figura 3. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação do controle sistemático experimental das amostras de SNs desafiadas com LPS. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; WATER = água; SUCC WAT = água sucussionada; LPS = lipopolissacarídeo de *E. coli*. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.

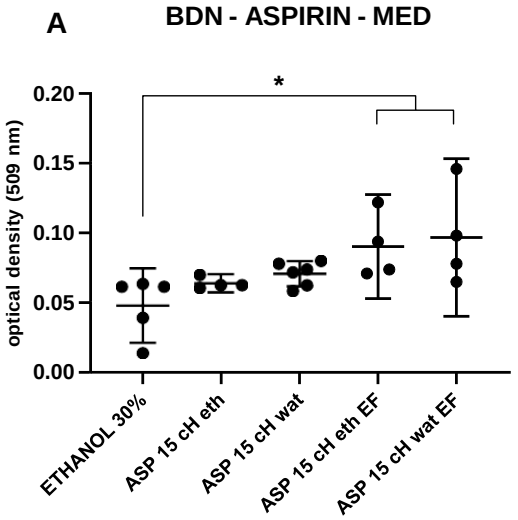




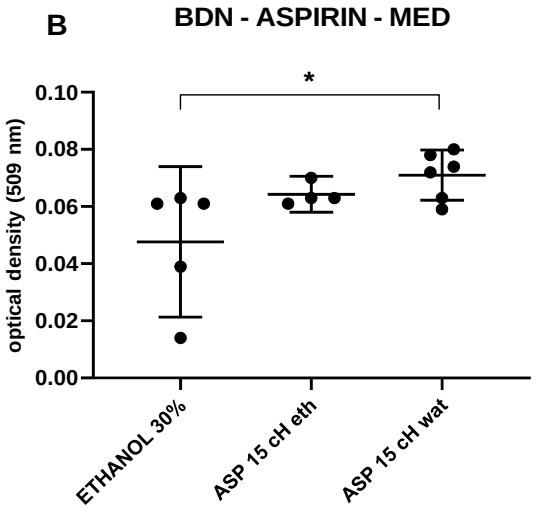
Avaliação do medicamento Aspirina 15cH em diferentes condições

O corante BDN mostrou interação com Aspirina 15cH preparada em água e Aspirina 15cH-EF preparada tanto em água quanto em etanol 30%, em relação ao veículo. Os demais medicamentos não mostraram interação com Aspirina 15cH em nenhuma das formas de preparo (**Figura 4 – A/B**).

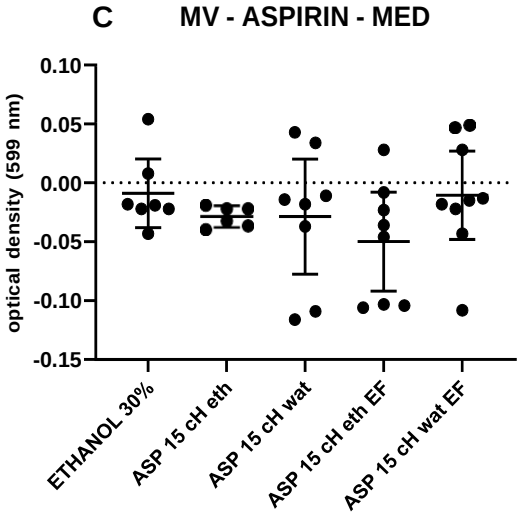
Figura 4. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação do medicamento Aspirina 15 cH – estudo comparativo entre diferentes preparações. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; ETHANOL 30% = etanol 30% (veículo); ETHANOL 30% SUCCUSSED = veículo sucussionado; ASP 15 cH eth = Aspirina 15 cH preparada com álccol; ASP 15 cH wat = Aspirina 15 cH preparada com água, ASP 15 cH eth EF = Aspirina 15 cH preparada com álcool e estimulada com corrente elétrica fraca; ASP 15 cH wat = Aspirina 15 cH EF preparada com água e estimulada com corrente elétrica fraca. Os veículos e medicamentos representados em cada gráfico correspondem aos utilizados especificamente neste estudo. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.



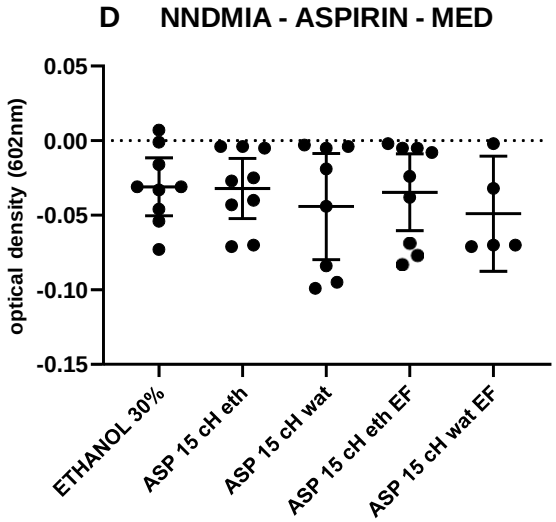
ANOVA, F(4,18)=4.123, p=0.015
Tukey, *p≤0.05



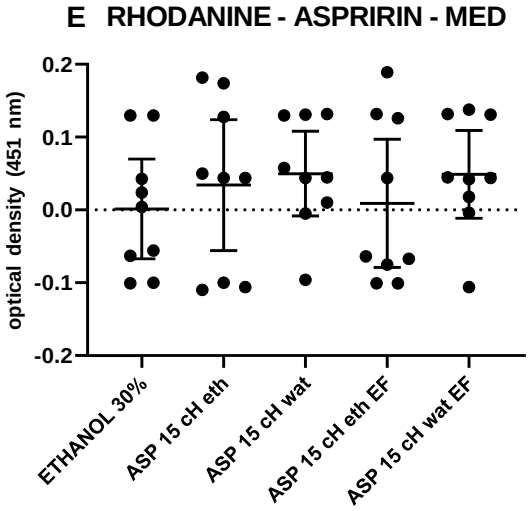
ANOVA, F(2,12)=4.205, p=0.041
Tukey, *p=0.035



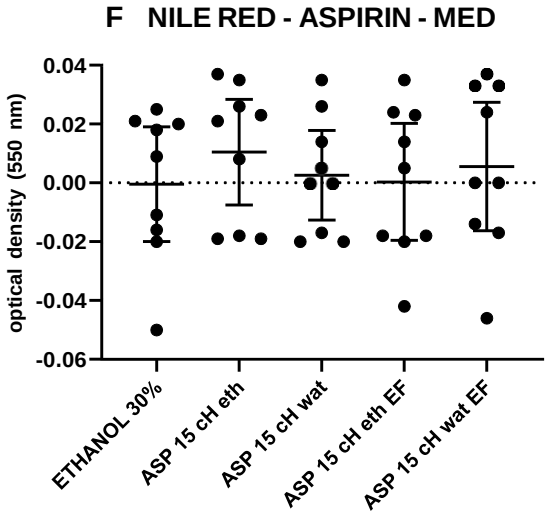
ANOVA, F(4,33)=1.081, p=0.3817



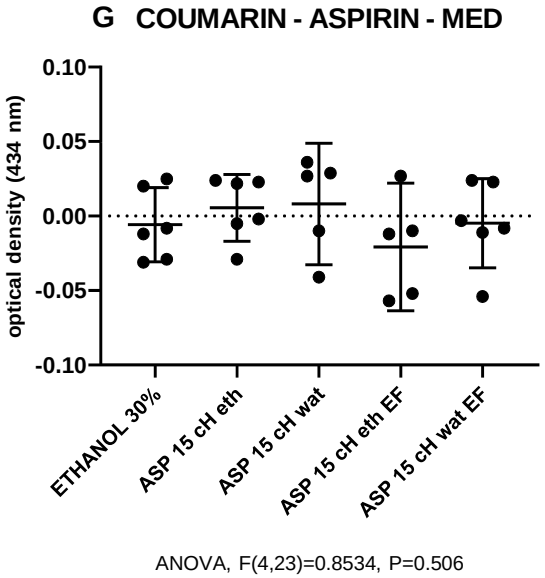
ANOVA, F(4,35)=0.4195, p=0.7934



ANOVA, F(4,40)=0.4877, p=0.7447



ANOVA, F(4,40) = 0.2896, p=0.8830

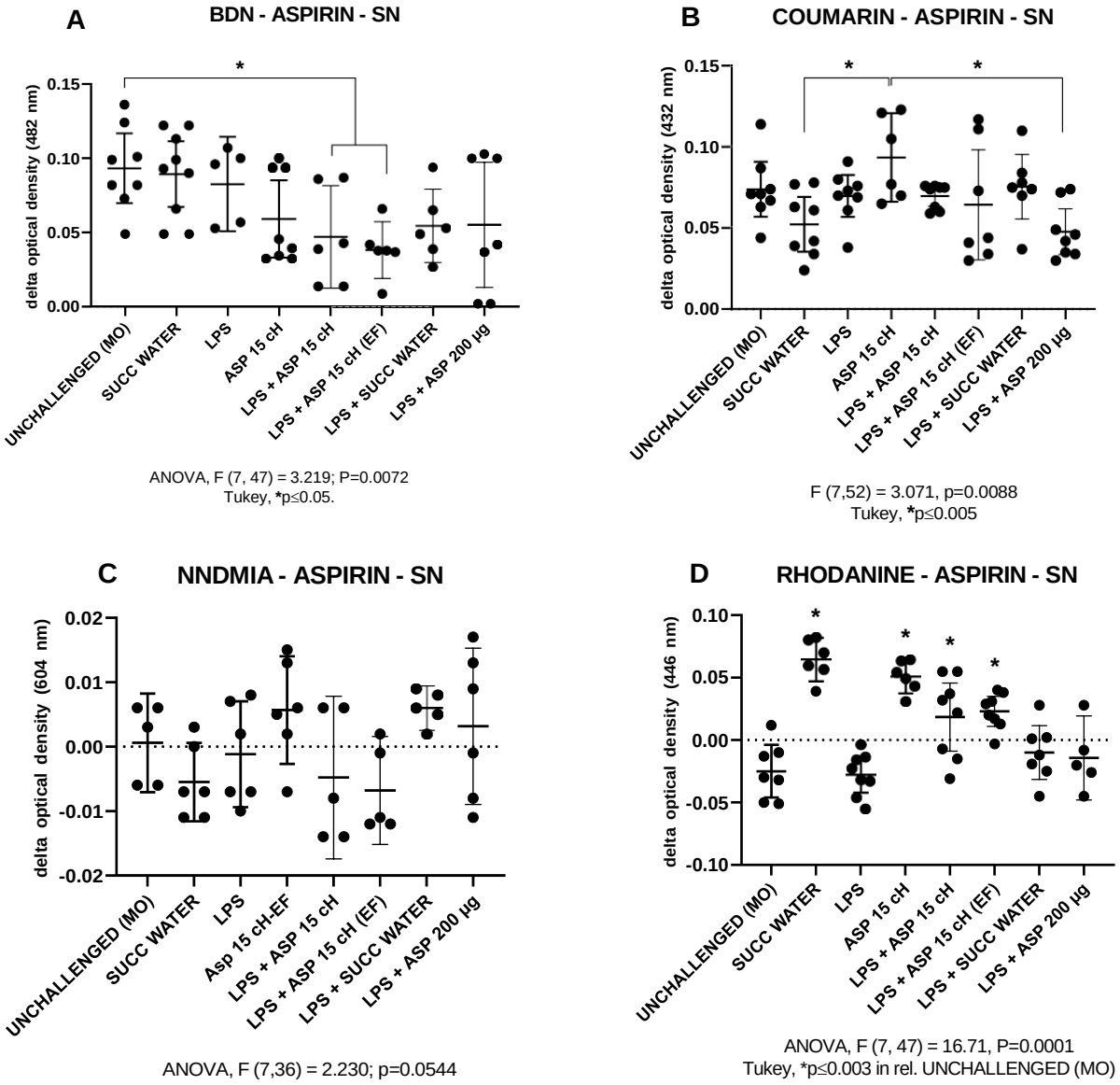


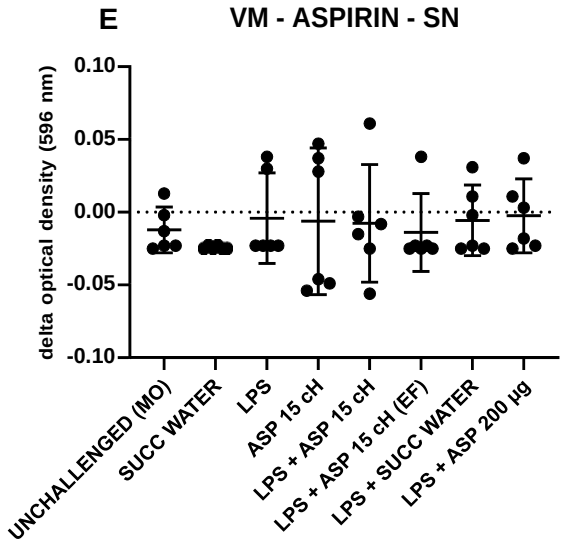
Avaliação dos sobrenadantes de macrófagos tratados com Aspirina 15cH desafiados ou não com LPS

O corante BDN mostrou especificidade para os SNs tratados com Aspirina 15cH e desafiados com LPS, sendo que a exposição da Aspirina 15cH ao fluxo elétrico antes do uso não alterou esse resultado. Ambos os grupos mostraram os menores níveis de absorbância relativa, sendo estatisticamente significantes quando comparados com o grupo não desafiado (*unchallenged*). Por outro lado, o corante Cumarina mostrou especificidade para os sobrenadantes não desafiados e tratados com Aspirina 15cH, cuja absorbância relativa foi maior em relação aos demais grupos, com significância estatística em relação ao controle negativo (SN tratado com água sucussionada) e ao controle positivo (SN desafiado com LPS e tratado com Aspirina 15cH). Nesse caso, a absorbância de todas as amostras de SNs desafiados com LPS mostraram níveis comparáveis ao grupo não desafiado (*unchallenged*) (**Figura 5 – A/B**).

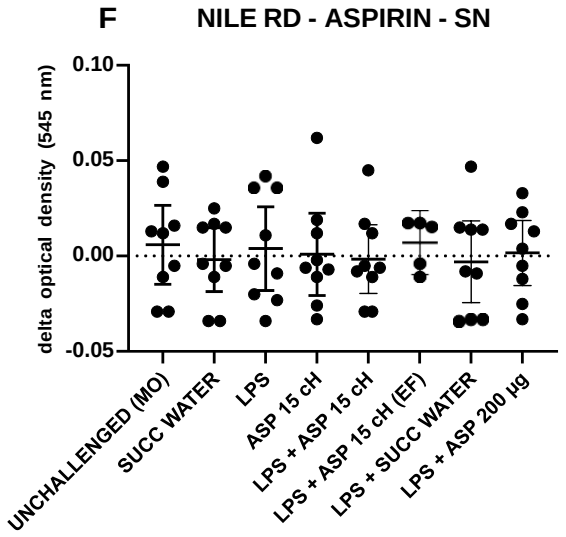
Curiosamente, a Rodanina mostrou aumento da absorbância relativa tanto dos SNs tratados com água sucussionada, quanto daqueles tratados com Aspirina 15cH, independente do desafio com LPS, sugerindo ser um marcador seletivo para as alterações do meio decorrentes do tratamento com insumos sucussionados (**Figura 5 - D**).

Figura 5. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de SNs de macrófagos desafiadas com LPS, tratados ou não com Aspirina 15cH. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; WATER = água; SUCC WAT = água sucussionada; LPS = lipopolissacarídeo de *E. coli*; UNCHALLENGED = sobrenadante de macrófagos não desafiados com LPS nem tratados; ASP = Aspirina; (EF) = medicamento submetido a 10 pulsos elétricos de 30 microampères por três segundos antes do tratamento da cultura celular. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.





Kruskal-Wallis, 5.715; p=0.5743

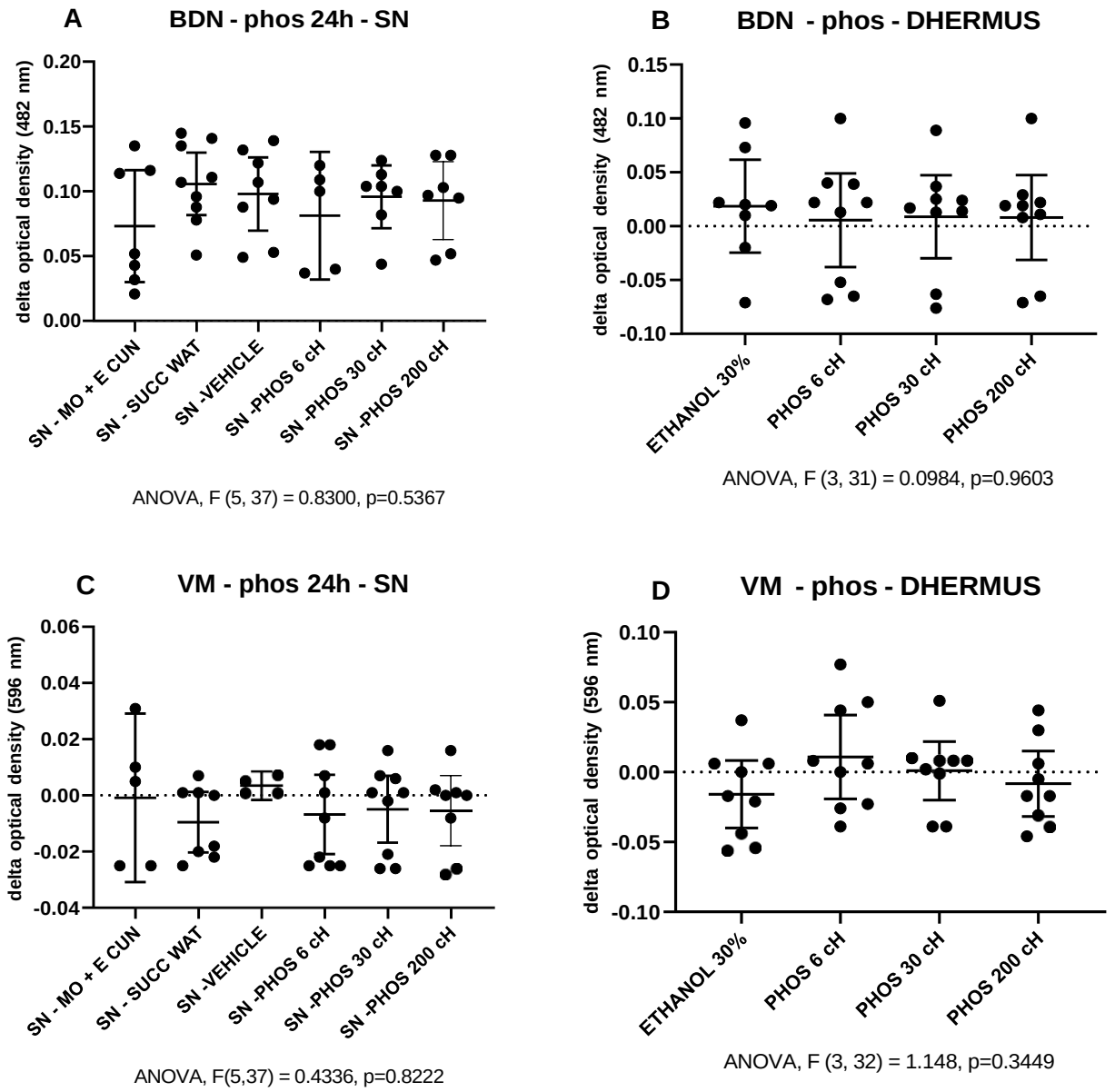


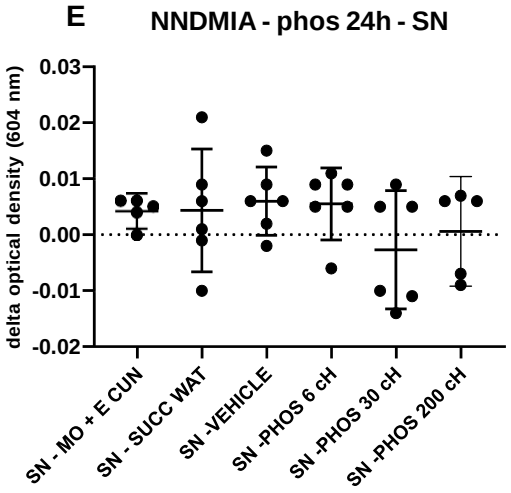
ANOVA, F (7, 60) = 0.1657, p=0.9910

4.4. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* por 24 horas e amostras dos próprios medicamentos

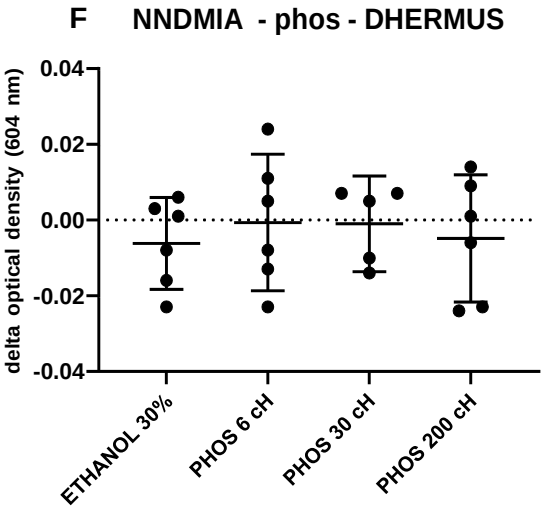
A absorbância relativa da Rodanina ao interagir com amostras de sobrenadante tratados com água sucussionada por 24 horas foi maior que a absorbância dos demais grupos, sendo essa diferença estatisticamente significante, exceto em relação ao sobrenadante tratado com *Phos 30cH.* SNs tratados com *Phos* 6cH e 200cH por 24 horas mostraram redução da absorbância relativa em relação aos controles (**Figura 6 – K**). Da mesma forma, o medicamento *Phos* 6cH mostrou interação com o corante Cumarina (**Figura 6 – J**). Tais resultados corroboram a especificidade da rodanina em apontar variações nos sobrenadantes decorrentes do tratamento com água sucussionada, bem como a especificidade da Cumarina como marcador do medicamento *Phos* 6cH (**Figura 6**). Importante notar o deslocamento no pico de absorbância entre o *Phos* 6cH (medicamento) e o SN tratado com *Phos* 6cH, considerando o espectro de luz visível. O *Phos* 6cH foi responsivo ao comprimento de onda de 482 nm (Cumarina) e o SN tratado com *Phos* 6cH foi responsivo ao comprimento de onda de 446 nm (Rodanina), um desvio de 36 nm (**Figura 6 – J/K**). Não houve interação dessas amostras com os demais corantes.

Figura 6. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de sobrenadantes de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* – comparação com amostras dos próprios medicamentos / veículo. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; PHOS = *Phosphorus*; VEHICLE ou ETHANOL 30% = etanol 30% (veículo); SN = sobrenadante; SN – MO + E CUN = sobrenadante de macrófagos infectados com *E. cuniculi*; SN – SUCC WAT – sobrenadante de macrófagos infectados com *E. cuniculi* e tratados com água sucussionada. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.

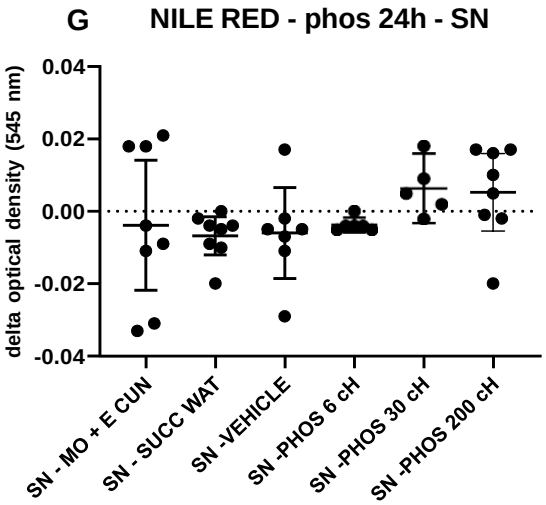




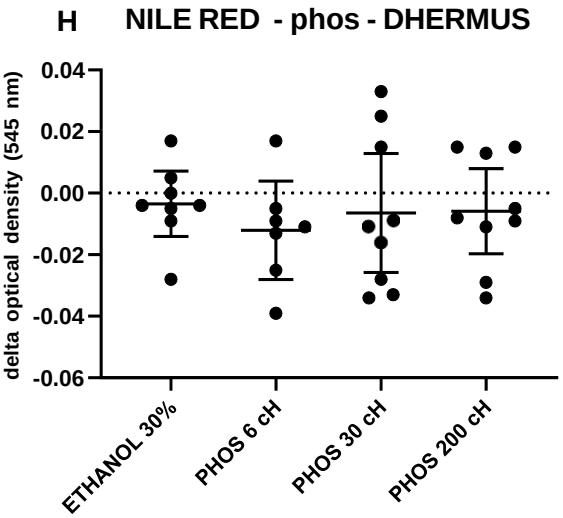
ANOVA, F (5,28) = 1.100, p=0.3826



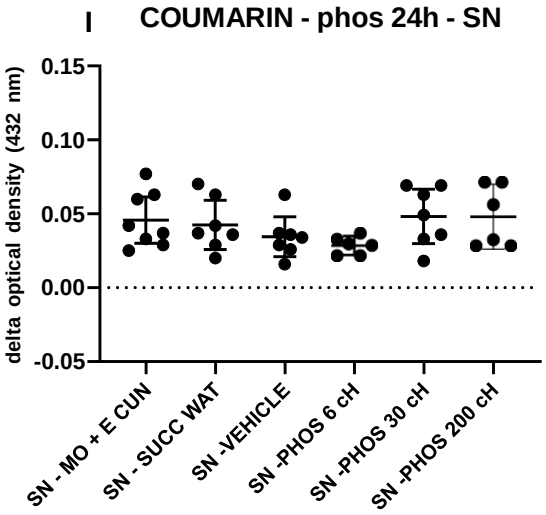
ANOVA, F (3, 19) = 0.2167, p=0.8836



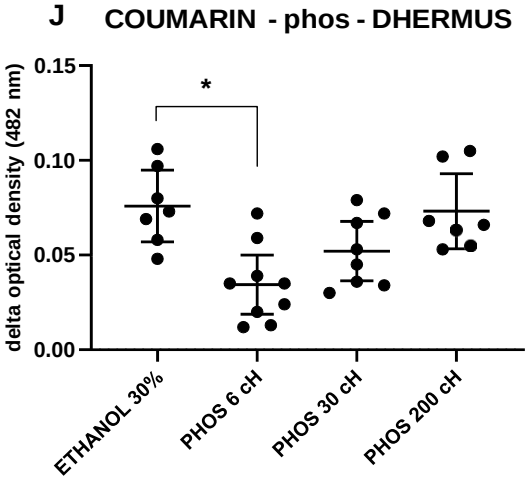
ANOVA, F(5, 36) = 1.328; p=0.2745



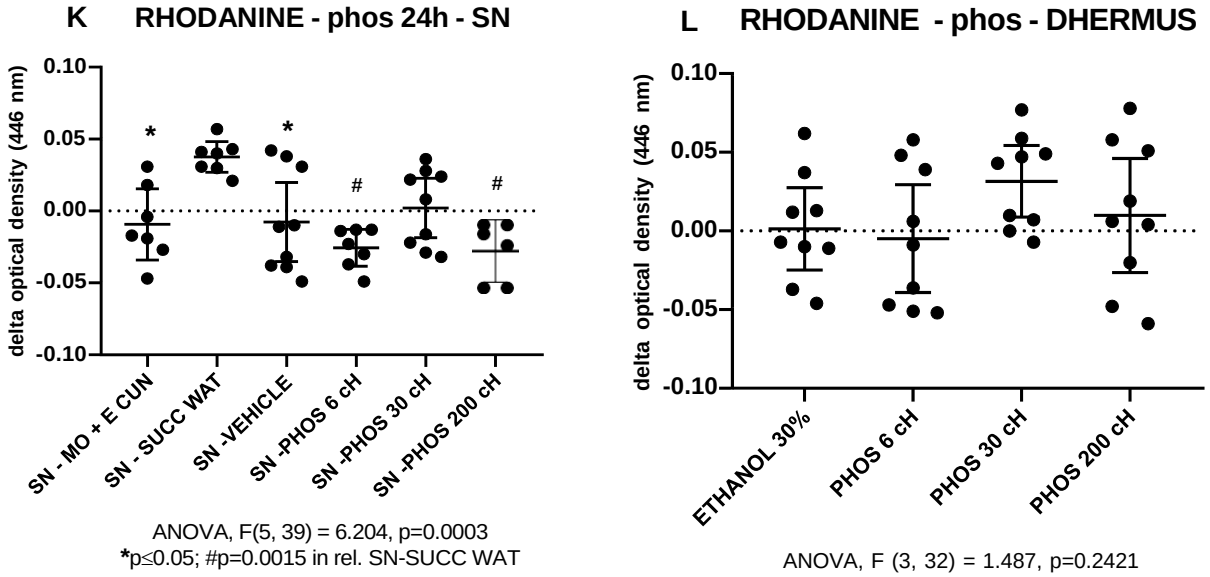
ANOVA (3, 29) = 0.2699, p=0.8465



ANOVA, F (5, 35) = 1.390, p=0.2520



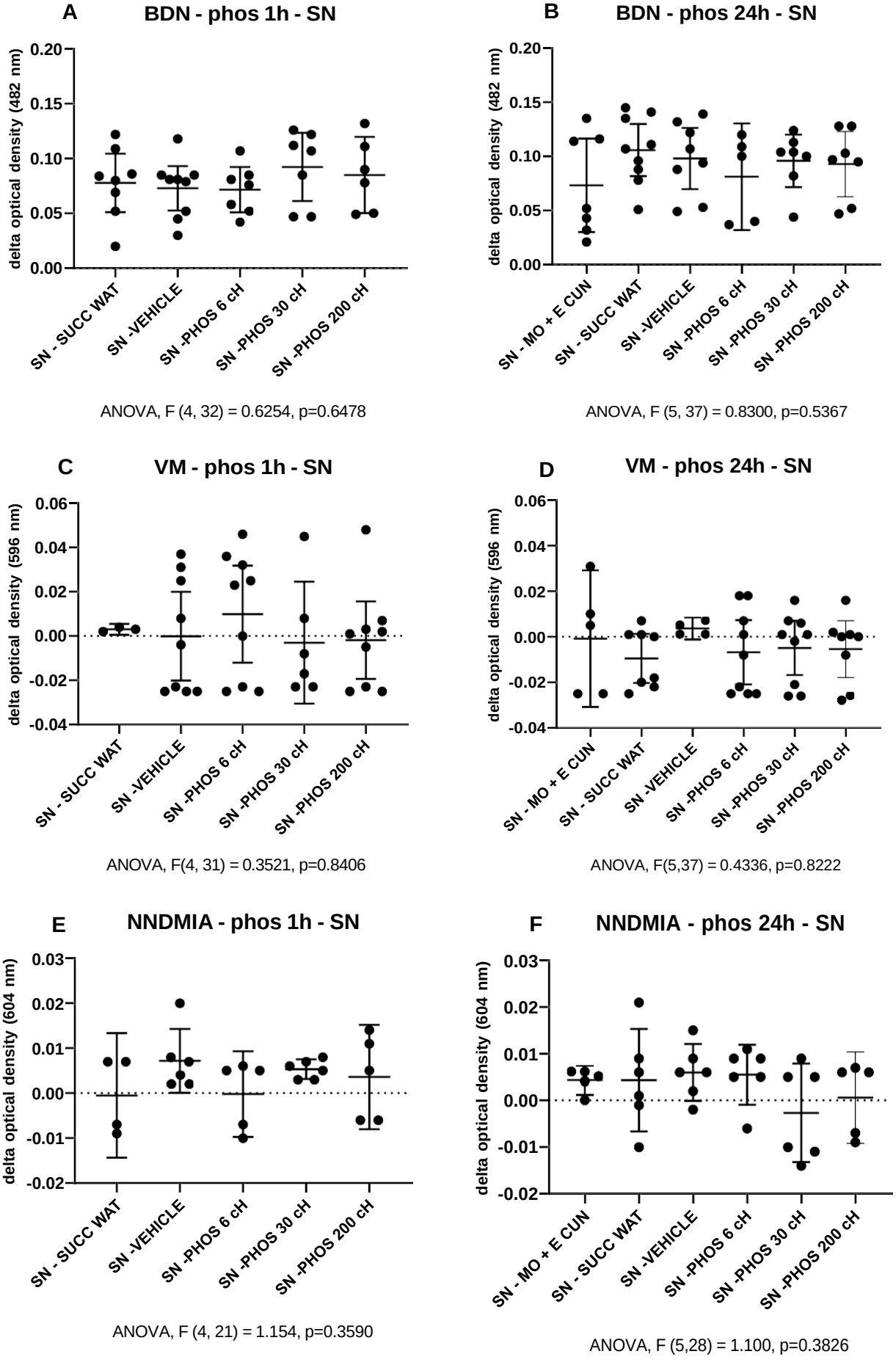
ANOVA, F (3, 27) = 7.429; p=0.0009
Tukey, *p=0.001

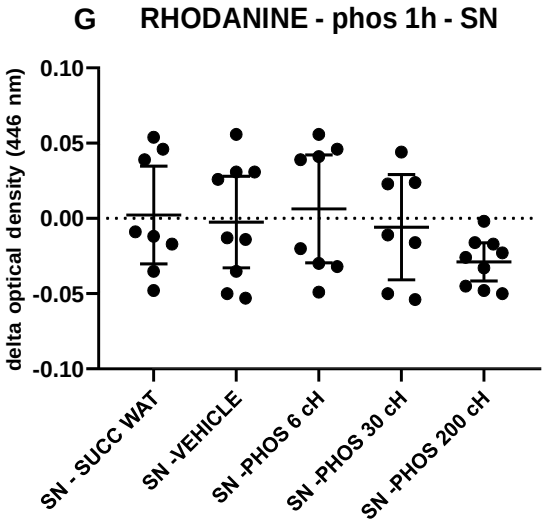


4.5. Avaliação das amostras de SNs de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* em diferentes tempos

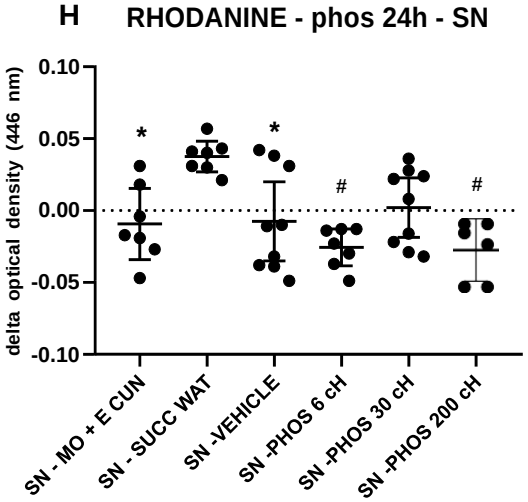
A interação dos corantes solvatocrômicos com amostras de sobrenadantes tratados com potências de *Phos* mostrou diferença entre os tempos de tratamento. Os efeitos sobre a Rodanina, descritos no item 4.5 foram observados apenas após 24 horas de tratamento dos sobrenadantes. Nenhum efeito foi observado após 1 hora de tratamento. Essa relação tempo-dependente corrobora a hipótese de que as variações nos sobrenadantes decorrentes do tratamento dependem de certo tempo de estabilização para que as amostras possam interagir com a Rodanina, provavelmente em função de mudanças tempo-dependentes das funções celulares (**Figura 7- H**).

Figura 7. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de sobrenadantes de macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com *Phosphorus* em diferentes tempos. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; PHOS = *Phosphorus*; VEHICLE = etanol 30% (veículo); SN – sobrenadante; SN – MO + E CUN = sobrenadante de macrófagos infectados com *E. cuniculi* (amostras de 1 hora indisponíveis); SN – SUCC WAT – sobrenadante de macrófagos infectados com *E. cuniculi* e tratados com água sucussionada. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.

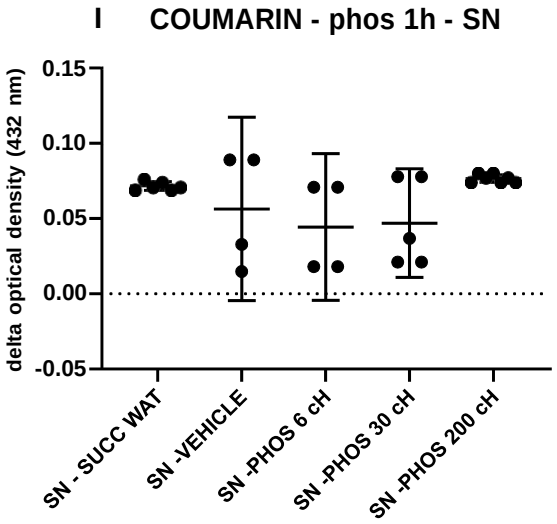

A
BDN - phos 1h - SN
delta optical density (482 nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F (4, 32) = 0.6254, p=0.6478
B
BDN - phos 24h - SN
delta optical density (482 nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
SN - MO + E CUN
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F (5, 37) = 0.8300, p=0.5367
C
VM - phos 1h - SN
delta optical density (596 nm)
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
-0.04
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F(4, 31) = 0.3521, p=0.8406
D
VM - phos 24h - SN
delta optical density (596 nm)
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
-0.04
SN - MO + E CUN
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F(5,37) = 0.4336, p=0.8222
E
NNDMIA - phos 1h - SN
delta optical density (604 nm)
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
-0.02
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F (4, 21) = 1.154, p=0.3590
F
NNDMIA - phos 24h - SN
delta optical density (604 nm)
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
-0.02
SN - MO + E CUN
SN - SUCC WAT
SN -VEHICLE
SN -PHOS 6 cH
SN -PHOS 30 cH
SN -PHOS 200 cH
ANOVA, F (5,28) = 1.100, p=0.3826



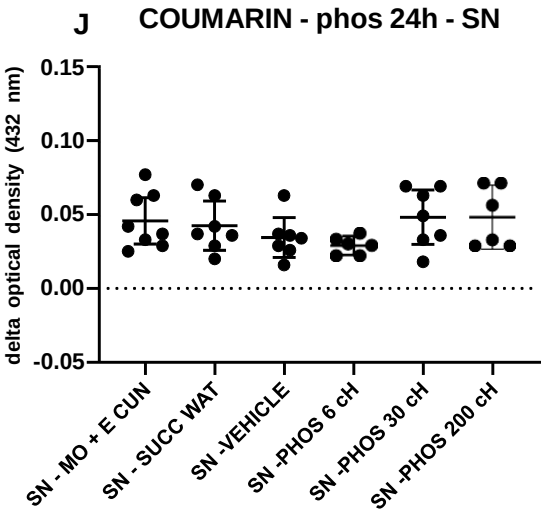
ANOVA, F (4, 36) = 1.271, p=0.2992



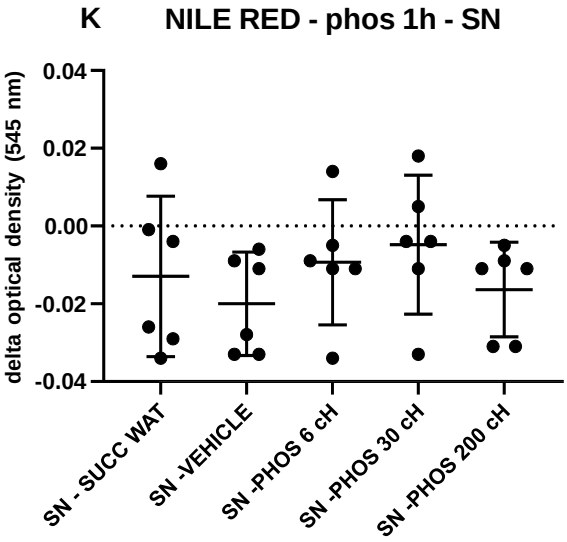
ANOVA, F(5, 39) = 6.204, p=0.0003
*p≤0.05; #p=0.0015 in rel. SN-SUCC WAT



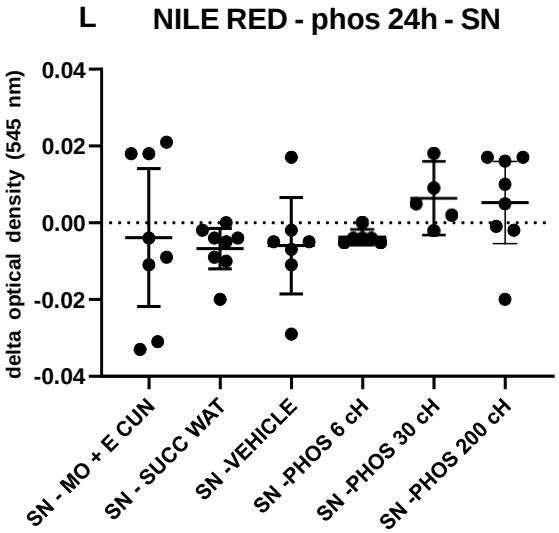
ANOVA (4, 21) = 2.226, p=0.1009



ANOVA, F (5, 35) = 1.390, p=0.2520



ANOVA, F(4, 25) = 0.8695, p=0.4959

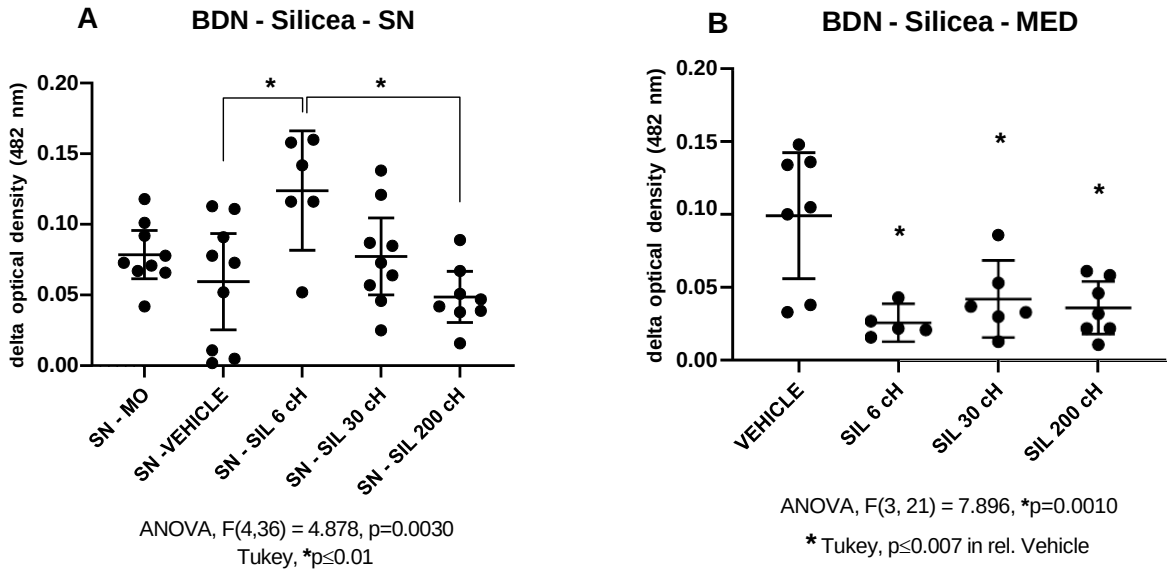


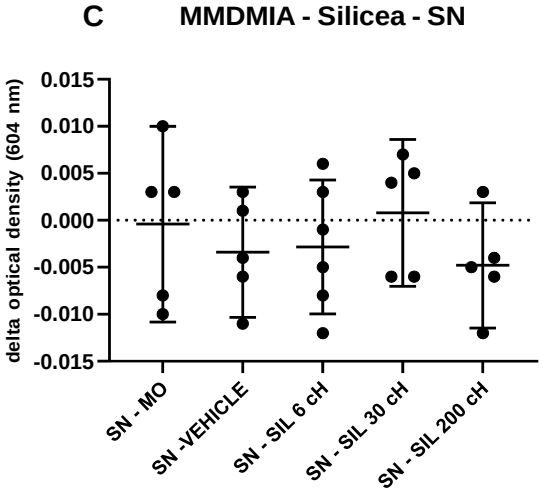
ANOVA, F(5, 36) = 1.328; p=0.2745

4.6. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* e amostras dos próprios medicamentos.

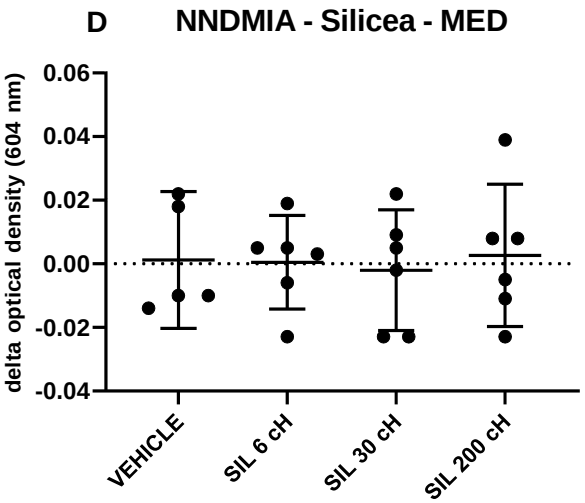
Nesse experimento, observou-se que o BDN interagiu com todas as três potências de *Silícea terra* (6 cH, 30 cH e 200cH) e apenas com o sobrenadante tratado com *Silicea terra* 6cH (**Figura 8 – A/B**). Assim sendo, houve uma clara correlação entre a *Silicea terra* 6cH e o sobrenadante tratado com esse mesmo medicamento, quando o BDN foi usado como marcador. As demais potências que não interagiram com o BDN (30 cH e 200cH), ao contrário, mostraram interação com o violeta metileno quando as amostras dos respectivos sobrenadantes foram analisadas (**Figura 8 - E**). Nota-se, portanto, certo "deslocamento" de 75 nm no pico de absorbância entre *Silicea terra* 30cH ou 200cH e o respectivo sobrenadante. Tal diferença pode ser atribuída à influência dos demais componentes do sobrenadante sobre o perfil de interação com o corante, à semelhança do que foi observado com *Phos* 6cH (**Figura 6, J e K**).

Figura 8. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* – comparação com amostras dos próprios medicamentos / veículo. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; SIL = *Silicea terra*; VEHICLE = etanol 30% (veículo); SN = sobrenadante; SN – MO = sobrenadante de macrófagos não infectados. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.

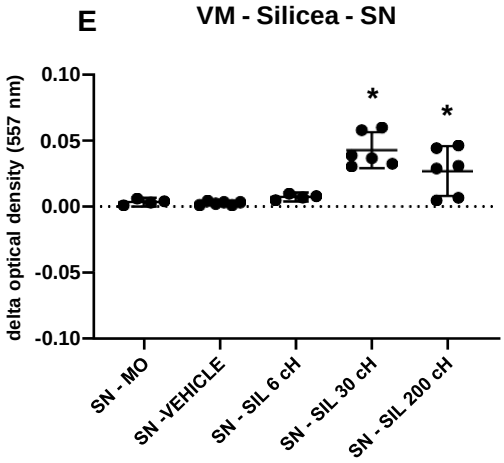




ANOVA, F(4, 21) = 0.6026, p=0.6650

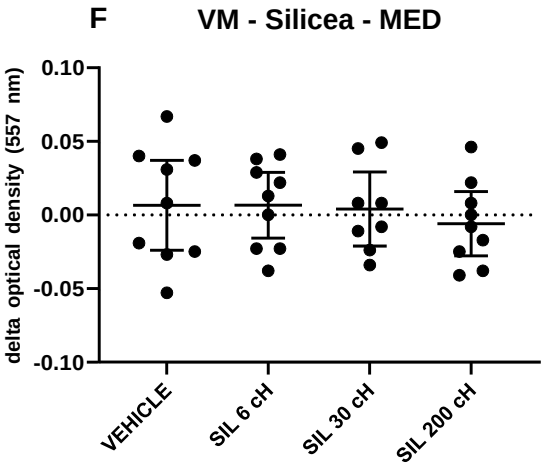


ANOVA, F(3, 19) = 0.0707, p=0.9749

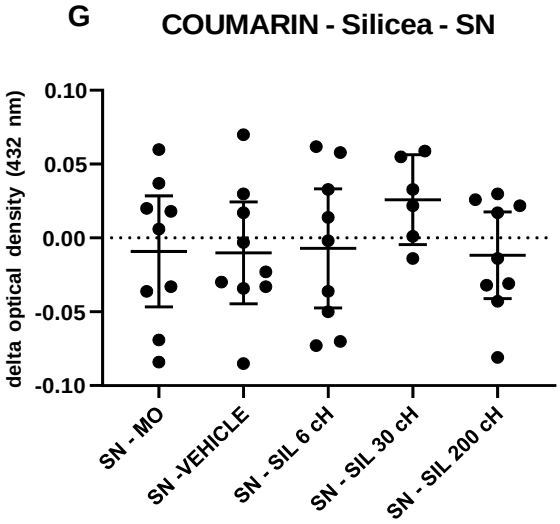


ANOVA, F(4, 21) = 15.30, p=0.0001

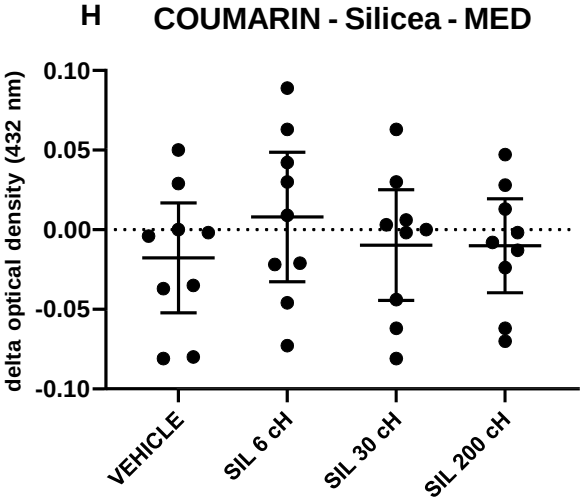
Tukey, *****p≤0.02 in rel. controls



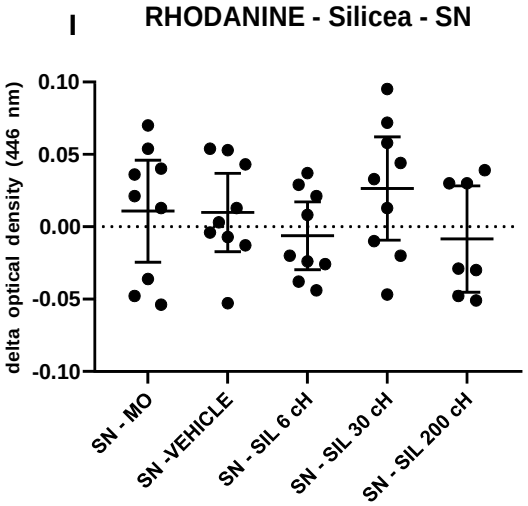
ANOVA, F(3, 31) = 0.3046, p=0.8219



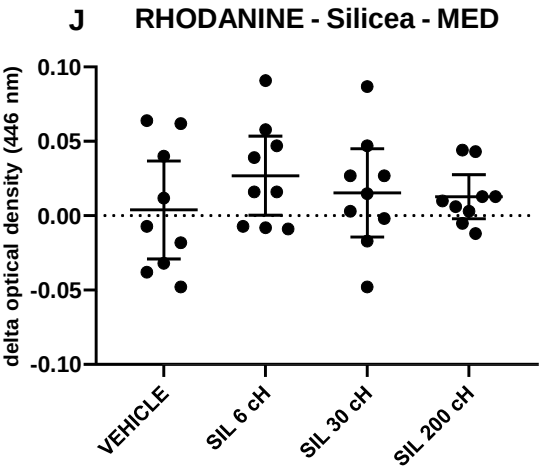
ANOVA, F(4,37) = 0.8315, p=0.5138



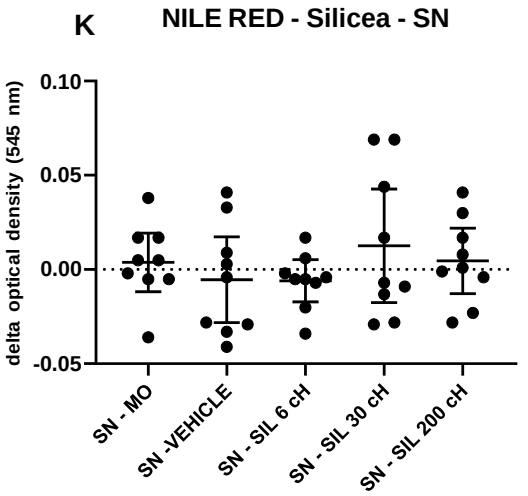
ANOVA, F(3, 32) = 05092, p=0.6788



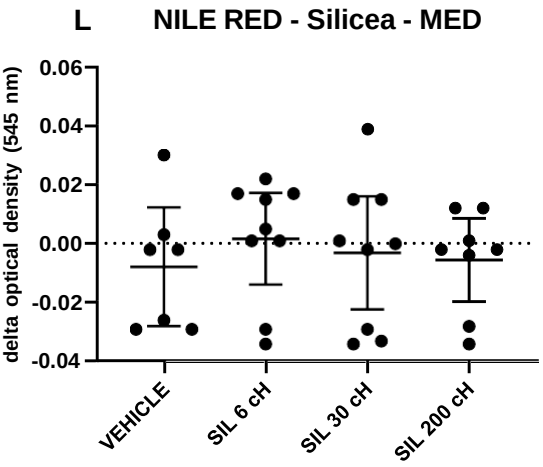
ANOVA, F(4, 38) = 1.073, p=0.3833



ANOVA, F(3, 32) = 0.6688, p=0.5774



ANOVA, F(4, 40) = 0.7646, p=0.5546

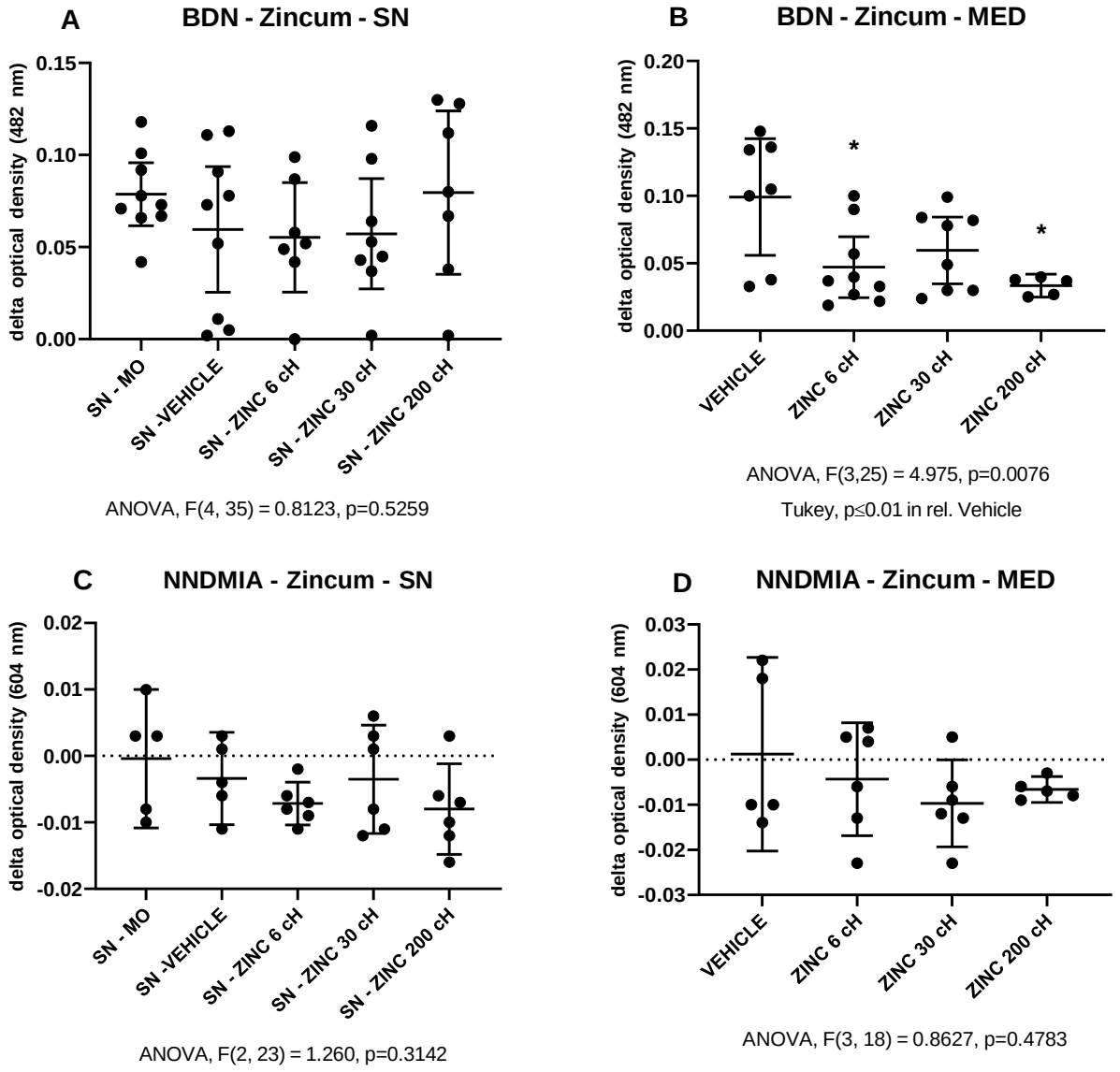


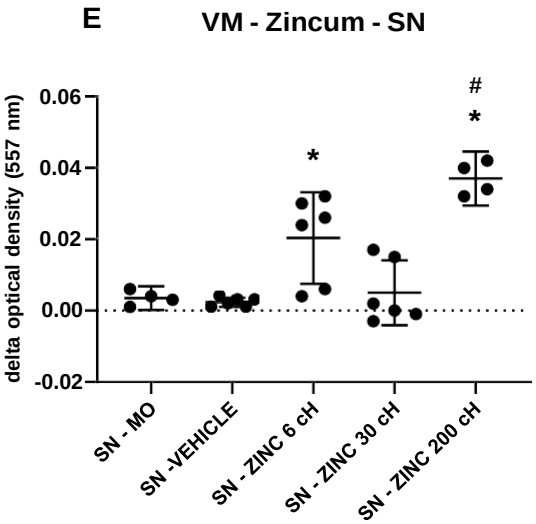
ANOVA, F(3, 29)=0.3028, p=0.8231

4.7. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Zincum metallicum* e amostras dos próprios medicamentos

O corante BDN interagiu com o medicamento *Zincum metallicum* 6 cH e 200cH. As amostras dos sobrenadantes tratados com *Zincum metallicum* 6 cH e 200 cH foram marcadas pelo corante Violeta metileno (**Figura 9 – B/E**). Mais uma vez, observa-se o “desvio para a direita” de 75 nm no espectro de luz visível entre amostras puras de medicamentos e os respectivos sobrenadantes.

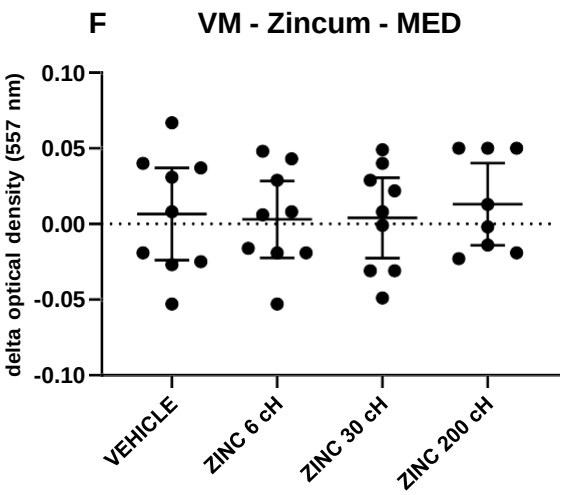
Figura 9. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Zincum metallicum* – comparação com amostras dos próprios medicamentos / veículo. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; ZINC = *Zincum metallicum*; VEHICLE = etanol 30% (veículo); SN = sobrenadante; SN – MO = sobrenadante de macrófagos não infectados. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.



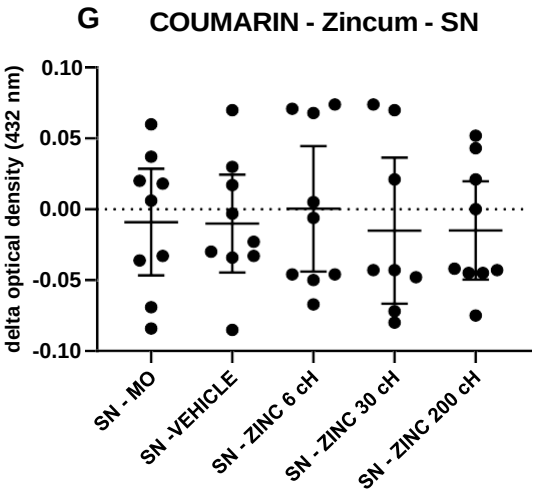


ANOVA, F(4, 21) = 17.52, p=0.0001

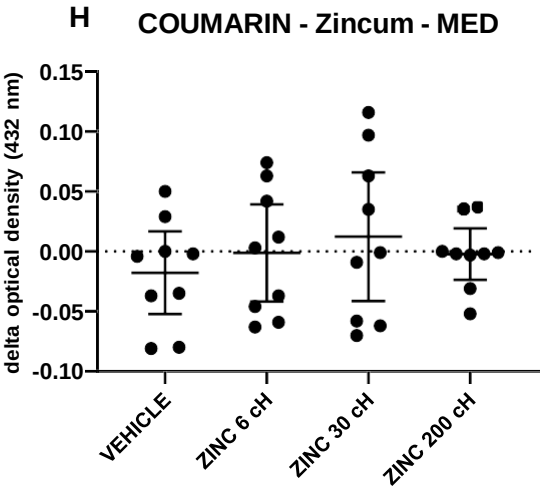
Tukey, *p=0.03 in rel. controls
Tukey, #p=0.03 in rel. SN - ZINC 6 cH



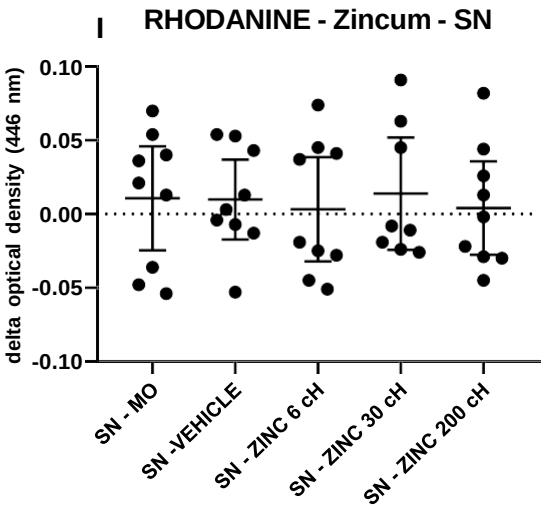
ANOVA, F(3, 31) = 0.1394, p=0.9357



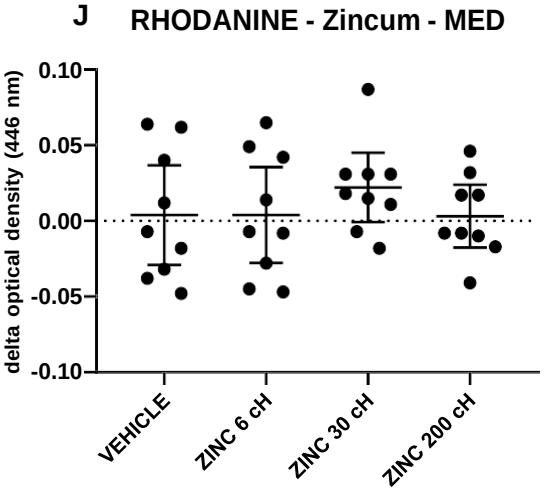
ANOVA, F(4,39) = 0.1296, p=0.9707



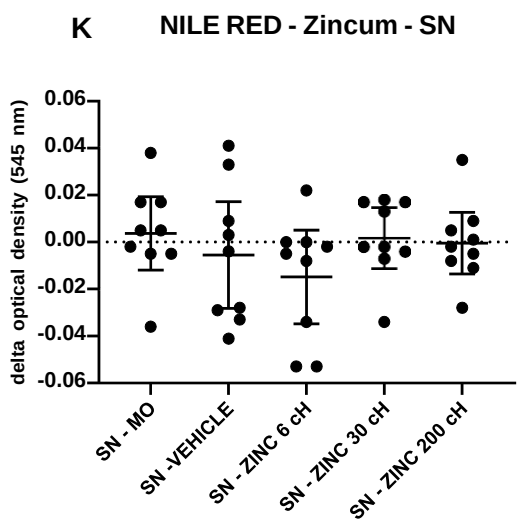
ANOVA, F (3, 32) = 0.5231, p=.6695



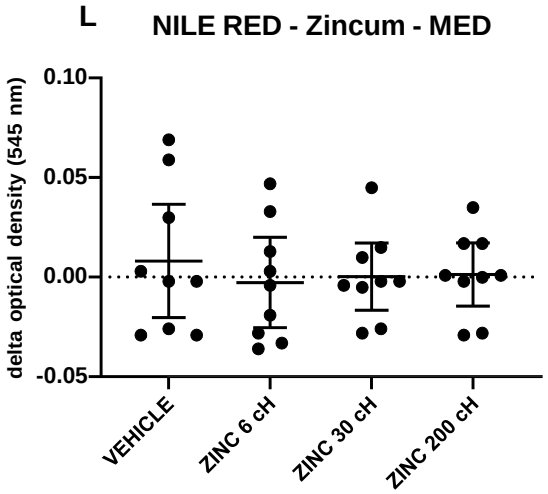
ANOVA, F(4,39) = 0.0967, p=0.9829



ANOVA, F(3, 32) = 0.5979, p=0.6211



ANOVA, F(4, 40) = 0.9761, p=0.4314

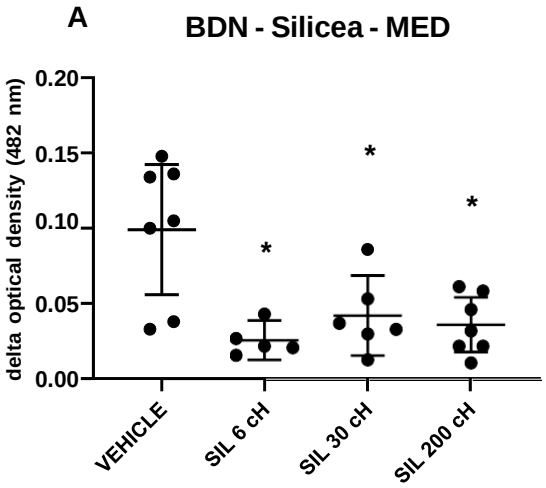


ANOVA, F(3, 32) = 0.2371, p=0.8698

4.8. Estudo comparativo entre amostras de *Silicea terra* e *Zincum metallicum*

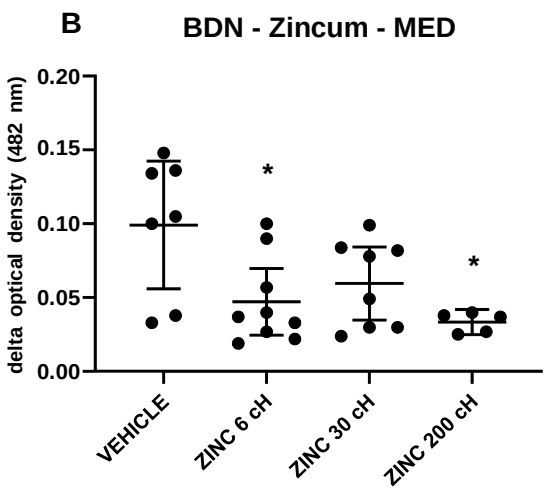
O corante BDN marcou *Silicea terra* 6 cH, 30 cH e 200 cH e *Zincum metallicum* 6 cH e 200cH em relação aos respectivos veículos (**Figura 10 – A/B**).

Figura 10. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de amostras de *Silicea terra* e *Zincum metallicum*. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; SIL = *Silicea terra*; ZINC = *Zincum metallicum*; VEHICLE = etanol 30% (veículo). Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.



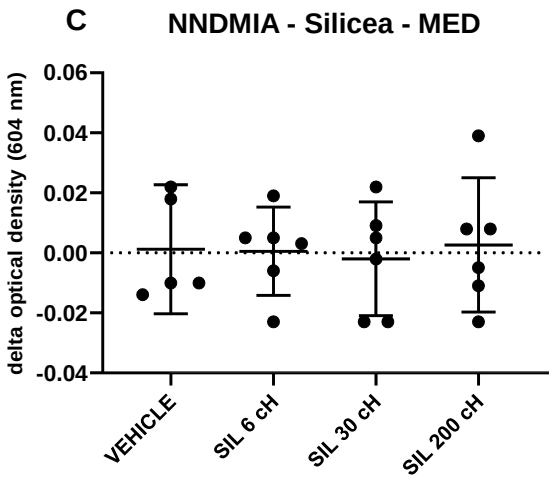
ANOVA, F(3, 21) = 7.896, *p=0.0010

* Tukey, p≤0.007 in rel. Vehicle

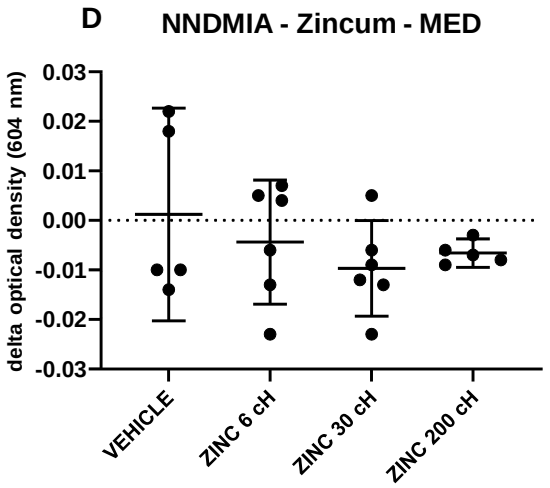


ANOVA, F(3,25) = 4.975, p=0.0076

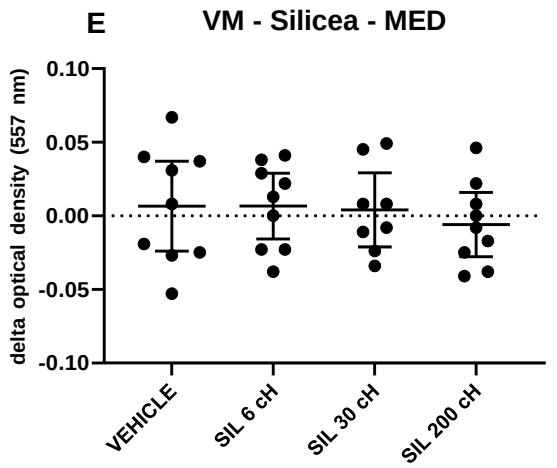
Tukey, p≤0.01 in rel. Vehicle



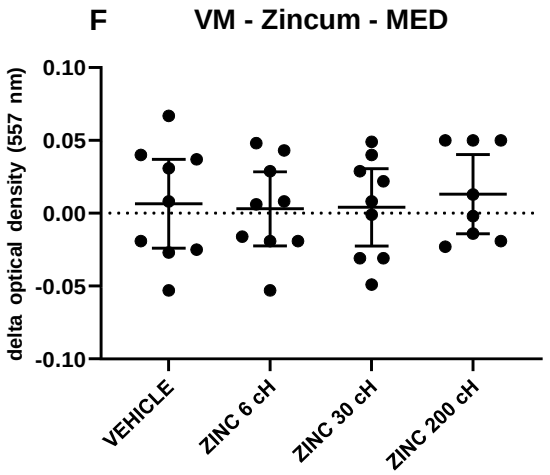
ANOVA, F(3, 19) = 0.0707, p=0.9749



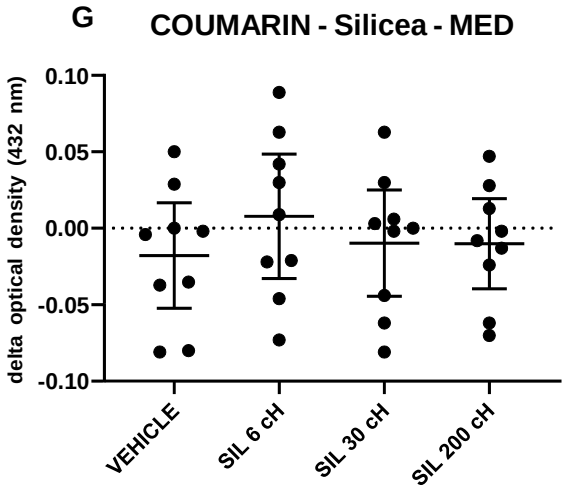
ANOVA, F(3, 18) = 0.8627, p=0.4783



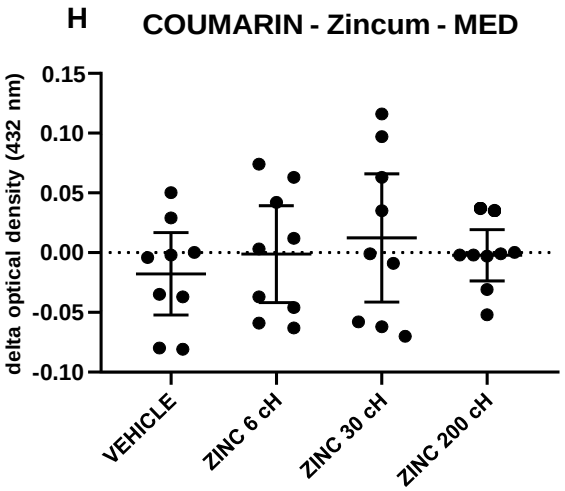
ANOVA, F(3, 31) = 0.3046, p=0.8219



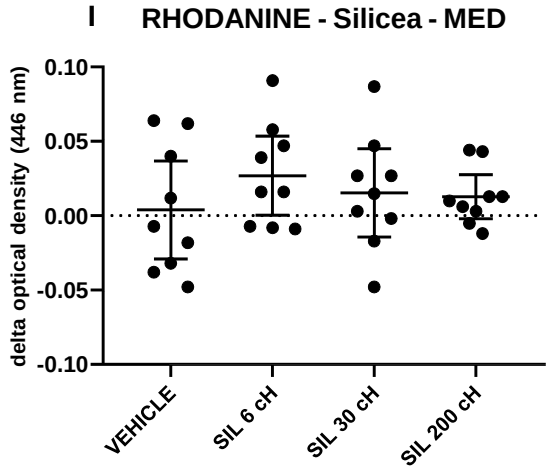
ANOVA, F(3, 31) = 0.1394, p=0.9357



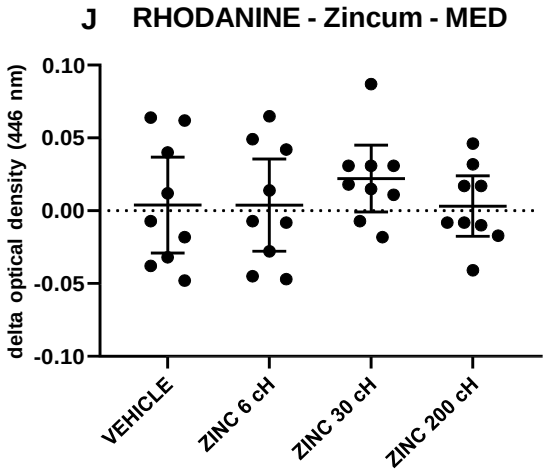
ANOVA, F(3, 32) = 05092, p=0.6788



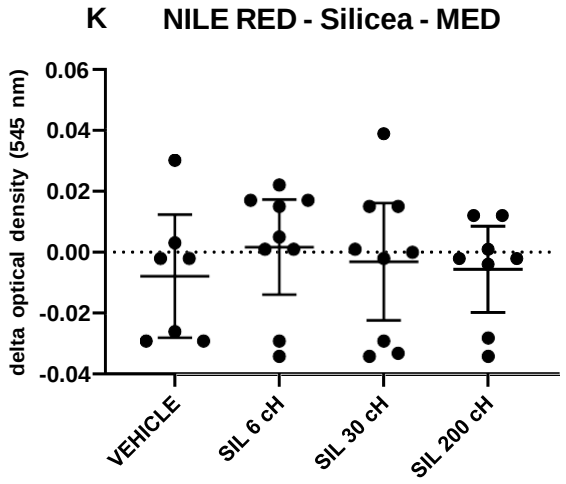
ANOVA, F (3, 32) = 0.5231, p=.6695



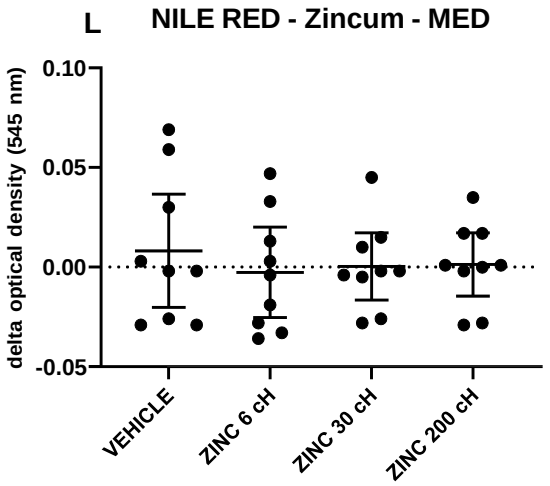
ANOVA, F(3, 32) = 0.6688, p=0.5774



ANOVA, F(3, 32) = 0.5979, p=0.6211



ANOVA, F(3, 29)=0.3028, p=0.8231

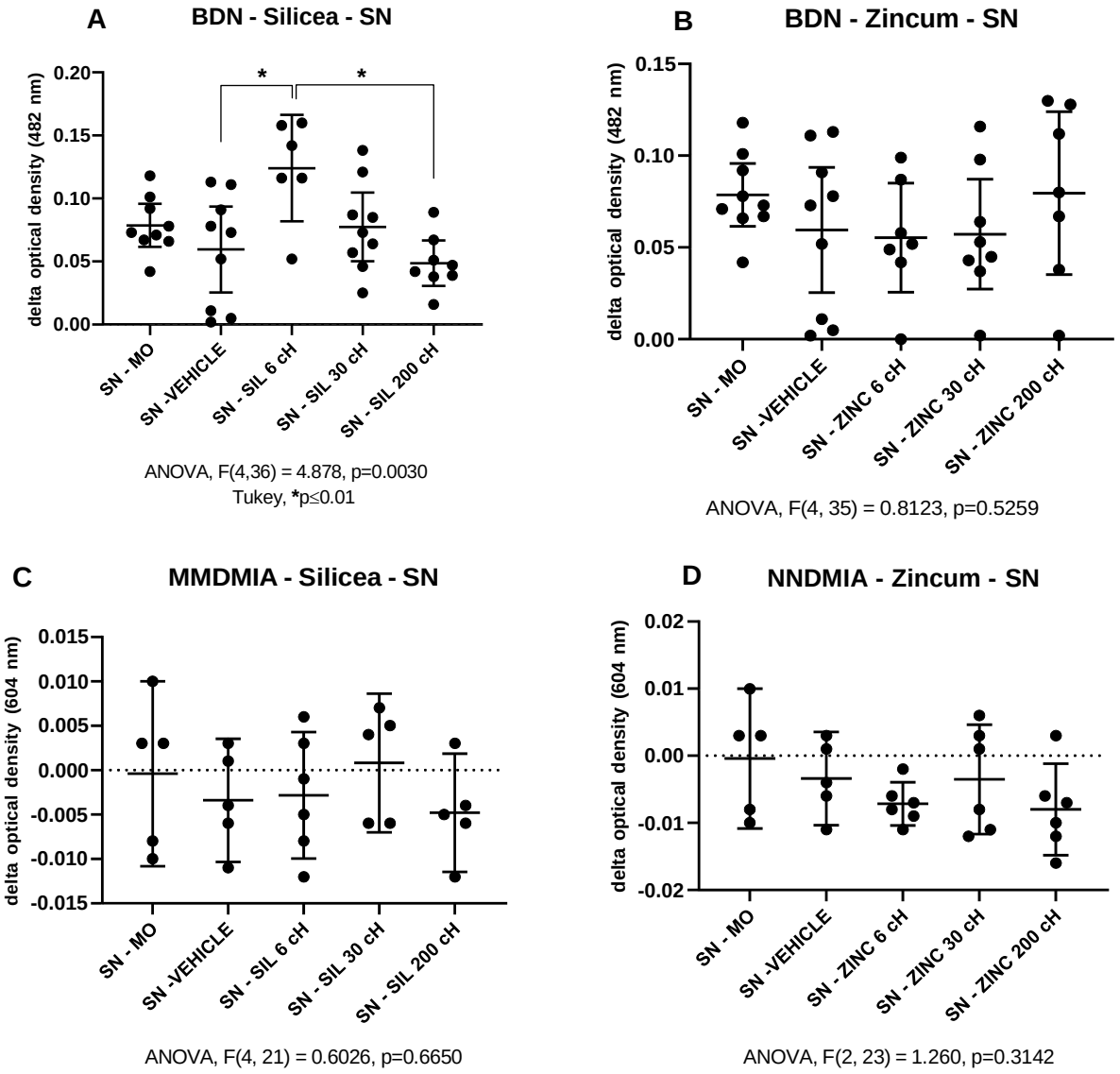


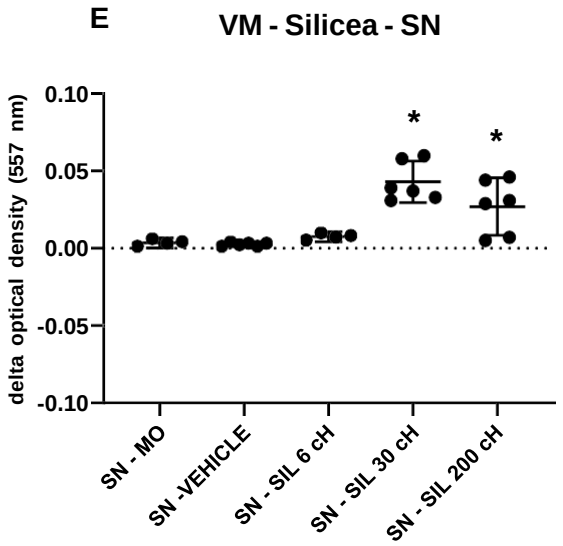
ANOVA, F(3, 32) = 0.2371, p=0.8698

4.9. Estudo comparativo entre amostras de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* e *Zincum metallicum*

O corante BDN marcou apenas o sobrenadante tratado com *Silicea terra* 6 cH e corante Violeta metileno marcou especificamente os sobrenadantes tratados com *Silicea terra* 30 cH e 200 cH e *Zincum metallicum* 6 cH e 200 cH, em relação aos controles (**Figura 11 – A, E, F**), deixando mais uma vez evidente o desvio de 75nm entre os picos de amostras de medicamentos e sobrenadantes.

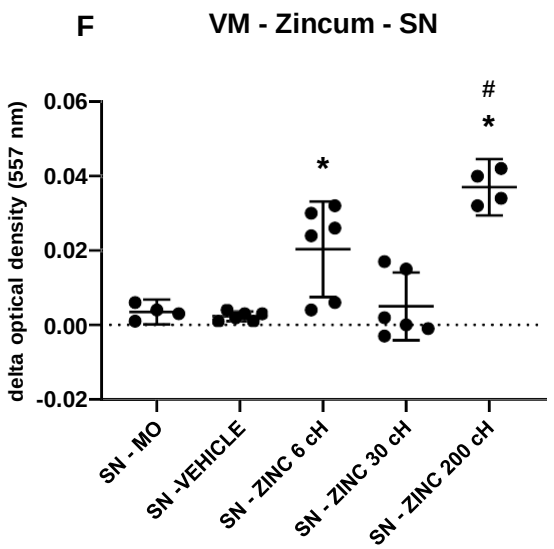
Figura 11. *Screening* de corantes solvatocrômicos para avaliação de sobrenadantes de macrófagos desafiados com BCG e tratados com *Silicea terra* e *Zincum metallicum* – estudo comparativo. Os valores representam a média ± intervalo de confiança de 95%. COUMARIN = Cumarina; RHODANINE = Rodanina; VM = Violeta metileno; NILE RED = Vermelho do Nilo; SIL = *Silicea terra*; ZINC = *Zincum metallicum*; VEHICLE = etanol 30% (veículo); SN = sobrenadante; SN – MO = sobrenadante de macrófagos não infectados. Os dados estatísticos estão representados em cada gráfico.





ANOVA, F(4, 21) = 15.30, p=0.0001

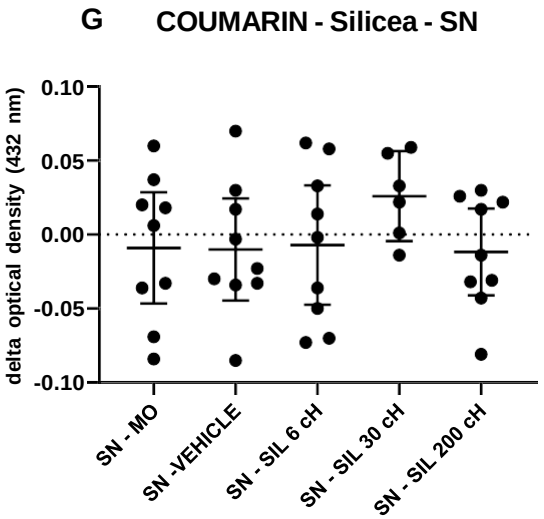
Tukey, *p≤0.02 in rel. controls



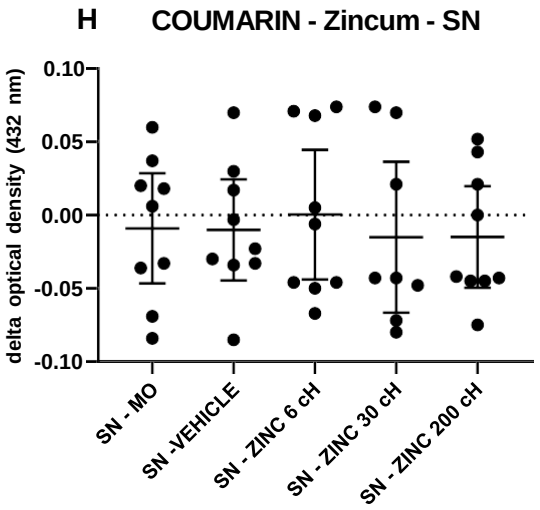
ANOVA, F(4, 21) = 17.52, p=0.0001

Tukey, *p=0.03 in rel. controls

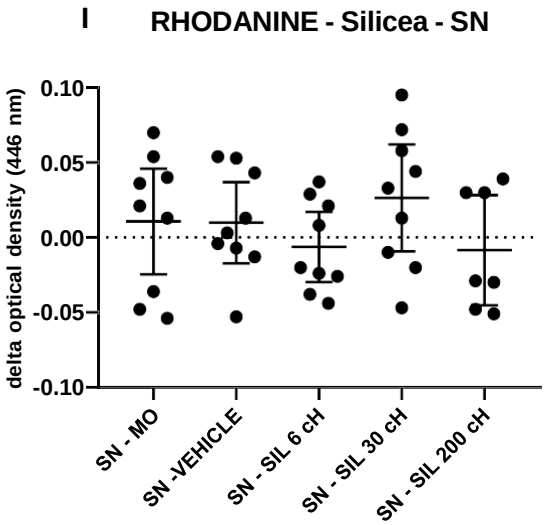
Tukey, #p=0.03 in rel. SN - ZINC 6 cH



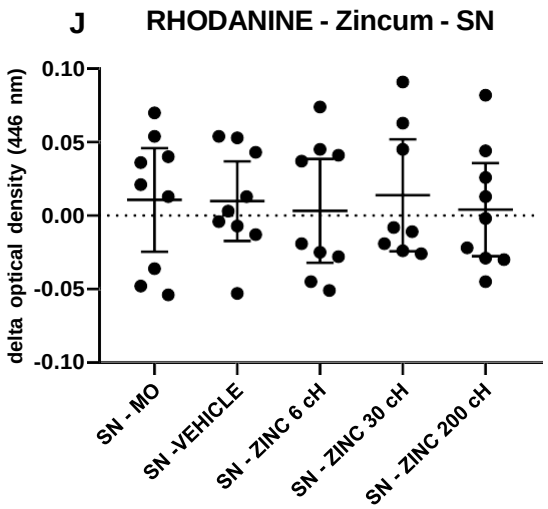
ANOVA, F(4,37) = 0.8315, p=0.5138



ANOVA, F(4,39) = 0.1296, p=0.9707

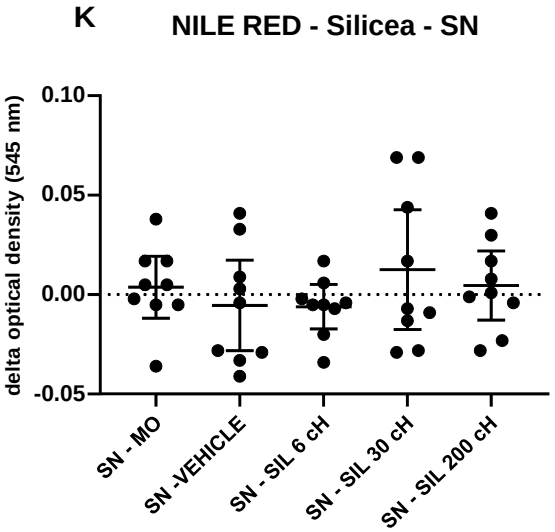


ANOVA, F(4, 38) = 1.073, p=0.3833



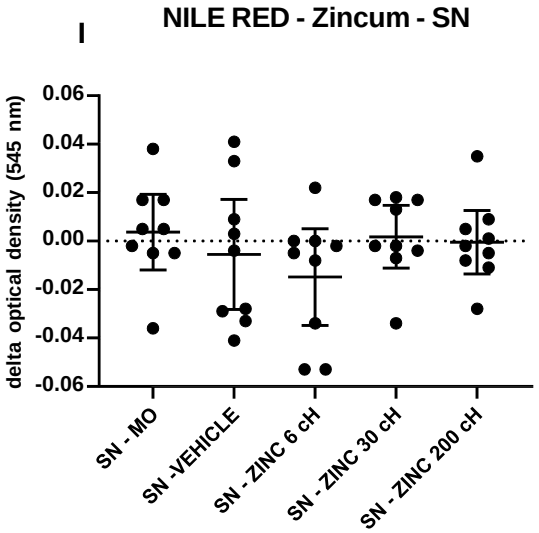
ANOVA, F(4,39) = 0.0967, p=0.9829

K



ANOVA, F(4, 40) = 0.7646, p=0.5546

I



ANOVA, F(4, 40) = 0.9761, p=0.4314

5. Discussão

Esse estudo teve como objetivo avaliar se corantes solvatocrômicos podem ser usados como método de escolha de medicamentos homeopáticos em diferentes situações, ou como marcador físico-químico da atividade desses medicamentos, baseado na comparação de interações entre diferentes corantes e diferentes amostras de medicamentos homeopáticos ou de sobrenadantes de culturas celulares tratadas com os mesmos medicamentos. Para isso, amostras armazenadas a -80ºC provenientes de estudos anteriores foram escolhidas.

Os experimentos anteriores versaram sobre o estudo da regulação da atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*, em diversas situações, tais como: após desafio com LPS e tratamento com Aspirina 15 cH (VON ANCKEN, 2021); após desafio com *Encephalitozoon cuniculi* e tratamento com *Phosphorus* (NAGAI *et al*., 2019) e após o desafio com BCG e tratamento com *Silicea terra* e *Zincum metallicum* (PINTO *et al*., 2021). Os resultados obtidos nesses estudos instigaram a observação de parâmetros físico-químicos desses medicamentos, os quais pudessem mostrar associação ou não com os respectivos efeitos biológicos.

Previamente, foram feitas análises sistemáticas de padrões morfológicos de micropartículas, observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de condutividade elétrica e, posteriormente, o comportamento dipolo do solvente foi avaliado pelo método de Cartwright (DALBONI *et al*., 2018; BONAMIN *et al*., 2020). Este método sinaliza possíveis mudanças no balanço de cargas das soluções, produzindo variações na absorbância de corantes solvatocrômicos, as quais são observáveis por espectrofotometria (CARTWRIGHT, 2018; 2019; 2020). Alguns corantes solvatocrômicos ligam-se aos cátions bivalentes do solvente produzindo mudanças ópticas, quando estimulados pela potência homeopática, enquanto outros se comportam absorvendo o comprimento de onda longa, na medida em que a polaridade do solvente diminui (CARTWRIGHT, 2016; 2017; 2018a). Isso ocorre nos corantes de carga predominantemente negativa. Os corantes positivos, por sua vez, absorvem o comprimento de onda curta, na medida em que diminui a polaridade do solvente. Este fato permite a interferência destes corantes como sinalizadores. Corantes solvatocrômicos mudam sua intensidade de cor e são especialmente sensíveis em resposta à mudança na polaridade do microambiente, viscosidade e ordem molecular (KLYMCHENKO, 2017).

A alta sensibilidade destes corantes sugere, então, sua utilização não apenas como ferramenta para o conhecimento da natureza físico-química das potências

homeopáticas, mas também para identificar, de forma preditiva, sua ação em diversos sistemas biológicos (BONAMIN *et al*., 2020; APARICIO *et al.*, 2020 a,b; PINTO *et al*., 2021a).

Um estudo anterior permitiu a avaliação de amostras de água coletadas em um sistema de lagos utilizando o corante solvatocrômico violeta metileno como sonda, antes e após a imersão, na fonte, de *Phosphorus* 30 cH, para o tratamento de um lote de animais. Os resultados desse estudo foram surpreendentes (APARICIO *et al*., 2020a) e demonstraram a importância e o alcance prático desse método como forma de rastrear os efeitos de preparações homeopáticas em grandes volumes de água. Tal aplicabilidade é especialmente relevante, dado que o tratamento de grandes plantéis de animais e a irrigação de grandes plantações com produtos homeopáticos é fato rotineiro no Brasil (SOUZA, 2002, REAL, 2008; CASALI *et al*., 2011) e representa importante perspectiva de inovação tecnológica, face à crescente demanda para a redução de resíduos químicos nos produtos alimentares tanto de origem animal, quanto vegetal (OLIVEIRA e VIEGAS, 2004; VARGAS, 2004; REAL, 2008; VALENTIM-ZABOTT, 2008; COSTA, ARAÚJO e FREITAS, 2009; RESENDE, 2010; SIENA, 2010; BRACCINI, 2011; CASALI *et al*., 2011; RATH *et al*., 2018; BRACCINI *et al.,* 2019; FUZINATTO *et al*., 2019). Essa abordagem apresenta grande adaptabilidade ao modelo de produção orgânica, pois substitui o uso de substâncias nocivas que contaminam plantas, solo e água, ou mitiga seus efeitos nos sistemas vivos expostos a elas (PINTO *et al*., 2021); portanto, impacta na produção de alimentos ecologicamente sustentáveis (PINTO e DE ALMEIDA, 2002; SOUZA, 2002; REAL, 2008; BRACCINI *et al* 2019; SCHMIDT, 2020).

Em um modelo experimental, os efeitos atenuantes da toxicidade do cloreto de mercúrio em *Artemia salina* após o tratamento da água com *Mercurius corrosivus* 30cH também foi associado à interação desde medicamento com o corante solvatocrômico ET33 (PINTO *et al*., 2021a). Por outro lado, a propriedade solvatocrômica do corante cumarina sinalizou um potencial marcador físico-químico de importância preditiva para o isoterápico Glifosato 6cH (NAGAI, 2021).

Outra aplicação desse método diz respeito à pesquisa básica em homeopatia. A partir da hipótese da ressonância elétrica (SMITH, 2015; YINNON, 2011, 2017), pode-se sugerir uma linha de investigação sistemática sobre os mecanismos de ação das ultradiluições homeopáticas (KLEIN *et al*., 2018; TOURNIER *et al*., 2020). Outros métodos de análise de preparações homeopáticas associados a processos de ressonância, como o VibraHT, revelado por meio de imagens, também constataram sinais específicos de cada preparação homeopática em relação à água usada como controle (ZANCO *et al.*, 2021).

Contudo, o estabelecimento de correspondências entre efeitos biológicos decorrentes de tratamentos homeopáticos e frequências de ressonância ainda é incerto. Ainda que exploratória e entusiástica, essa abordagem poderia futuramente trazer uma nova ferramenta diagnóstica, caso seja demonstrada experimentalmente (CHATTOPADHYAY e MAHATA, 2016). A absorção de energia depende da estrutura eletrônica da molécula e, por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis tem ampla aplicação na caracterização de uma série de propriedades de diversas espécies orgânicas e inorgânicas (SMITH, 2015).

Recentemente, estudos preliminares sobre a correspondência entre os efeitos biológicos das diluições de *Antimonium crudum* e os efeitos do mesmo medicamento sobre corantes solvatocrômicos (BONAMIN *et al*., 2020) serviram de baliza para a realização de pesquisas voltadas para a validação dessa hipótese, como é o caso do presente trabalho. Nesse mesmo estudo, observou-se que diluições homeopáticas de *Antimonium crudum* são sensíveis à exposição a correntes elétricas fracas e repetidas.

A interação de potências homeopáticas com corantes solvatocrômicos tem sido minuciosamente estudada nos últimos anos. O uso de β-ciclodextrina para o encapsulamento das moléculas do corante reforça a hipótese de ressonância elétrica, pois evita o contato direto entre as moléculas do corante e o solvente polar (no caso, água, etanol e álcool butílico terciário), entretanto, a interação entre corante e potência homeopática se mantém, de forma que as oscilações de absorbância continuam a ocorrer da mesma forma que ocorreriam após a diluição direta do corante no respectivo solvente (CARTWRIGHT *In*: BONAMIN e WAISSE, 2019; CARTWRIGHT, 2020).

Entre os estudos realizados previamente *in vitro*, alguns medicamentos foram abordados, como *Silicea terra*, *Zincum metallicum*, *Antimonium crudum* e *Phosphorus*, cada um associado a perfis específicos segundo o agente infeccioso testado (NASCIMENTO *et al*. 2017; NAGAI *et al*., 2019; APARICIO *et al*., 2020a; BONAMIN *et al*., 2020; PINTO *et al.*, 2021). Por esse motivo, amostras de alguns desses estudos mantidas em arquivo foram utilizadas para a execução deste trabalho, sendo os medicamentos mantidos à temperatura ambiente, em local protegido de luz e livre de interferências eletromagnéticas e as amostras de sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 mantidas em freezer, à temperatura de -80ºC e em condição de esterilidade. Uma bateria de corantes e repetições foi organizada, em experimentos sequenciais conduzidos em cego, de forma que diferentes amostras de medicamentos e sobrenadantes pudessem ser testados em três séries (ou repetições) experimentais, sendo que em cada série as amostras foram processadas em triplicata.

A primeira fase do trabalho consumiu alguns meses de padronizações envolvendo cada passo da técnica aplicada, tais como: a) a necessidade de filtrar cada uma das amostras após a última agitação (30 vezes) imediatamente antes de colocá-las nas cubetas, para atenuar eventuais efeitos inespecíficos da lixiviação do frasco de vidro ou de contaminantes; b) manipular uma coleção fixa de 1cH preparada em álcool 30% a partir de todas as amostras de sobrenadante a 10%, à semelhança o que foi feito para a última potência dos medicamentos analisados, minimizando ao máximo interferências na leitura alheias às variações do próprio solvente; c) diluir todos os corantes em álcool P.A. para que todas as análises fossem comparáveis entre si e, ao mesmo tempo, garantir a solubilidade de todos eles; d) confeccionar recipiente específico para armazenamento e transporte de todas as amostras mantendo-as isoladas e protegidas até o término do experimento; e) utilizar somente frascos novos, iguais e autoclavados, feitos com vidro âmbar tipo 2, provenientes de um mesmo fornecedor; f) fazer experimento piloto para determinar o melhor padrão de cubetas.

Em relação ao preparo dos corantes e à espectrofotometria em si, outros procedimentos adicionais foram necessários para a devida padronização, como dupla checagem dos valores de pesagem e de espectrofotometria, avaliação de eventual decaimento de absorbância em função do tempo, padronização do horário das medidas e das condições ambientais, como temperatura, umidade e leitura do fluxo magnético. Outro fator importante de padronização foi o fluxo de trabalho, em que os corantes eram preparados em um dia e as análises eram feitas em três séries, em dias consecutivos. A proteção das amostras e dos corantes à luz foi observada em todas as etapas do processo, desde o preparo até a leitura em espectrofotômetro. Durante a leitura, outro cuidado importante foi o tempo transcorrido para fazer todas as análises, sem intervalos, para evitar a evaporação do álcool nas cubetas.

Todas as amostras analisadas foram diluídas 1:10 em água pura estéril antes da preparação da última potência centesimal em álcool 30%, com prazo de validade de dois anos, a fim de serem usadas sequencialmente nas análises espectrofotométricas. Assim sendo, todo material de partida (medicamento ou sobrenadante) foi diluído 1:1000 vezes antes da imersão nas cubetas, contendo os respectivos corantes. Dado que a proporção amostra / corante se dá na relação 1:60, tem-se que a concentração final do material bruto a ser submetida à análise foi de 1:60.000 ou $1,6 \times 10^{-3}$ %. Em termos práticos, zero. Esse procedimento exclui praticamente qualquer interferência de caráter molecular nas leituras, de forma que as oscilações de absorbância encontradas possam

ser atribuídas exclusivamente às mudanças de polaridade do solvente em função da natureza de cada amostra.

O cálculo da absorbância relativa permitiu que os valores a serem lançados na análise estatística fossem normalizados de acordo com o pico de absorbância do corante puro obtido no mesmo dia das análises, para cada repetição.

Finalmente, os resultados obtidos mostraram certa associação entre a interação dos medicamentos com os corantes solvatocrômicos e a interação dos respectivos sobrenadantes com os mesmos corantes, com poucos desvios, face às variações no comprimento de onda correspondente ao pico da absorbância observadas entre amostras de medicamentos e de sobrenadantes, com arraste de 35 a 75 nm, o que resultou na marcação por outro corante da mesma banda espectrométrica (regiões do violeta e do amarelo, dependendo da amostra). Tais correspondências entre resultados corrobora a hipótese dos corantes solvatocrômicos terem possível valor preditivo na determinação da atividade biológica das potências homeopáticas e no rastreamento dos sistemas líquidos tratados com insumos homeopáticos.

Um resumo dos resultados obtidos está listado no **Quadro 4**. Os resultados detalhados estão sumarizados em **Material suplementar 1 e 2.**

Curiosamente, observa-se que o corante Rodanina interatuou com água ou veículo sucussionados e com sobrenadantes de macrófagos desafiados ou não, mas igualmente tratados com tais veículos sucussionados. Em termos de efeito biológico, o tratamento do sobrenadante com veículo sucussionado induziu atividade pró-inflamatória e pró-oxidativa em macrófagos desafiados com LPS (VON ANCKEN, 2020) e aumento da produção de MCP-1, IL6 e TNFα em macrófagos desafiados com *E. cuniculi* (NAGAI *et al*., 2019). Desta maneira o corante Rodanina pode ser considerado um bom marcador relacionado à atividade de espécies reativas de oxigênio, de tal forma que sinalizou a atividade da água sucussionada como pró-inflamatória e pró-oxidativa em sobrenadantes de macrófagos desafiados com LPS. Da mesma forma, a Aspirina 15 cH pode modular manifestações inflamatórias de macrófagos RAW 264.7 desafiados com LPS, aumentando o *spreading* e a concentração de H_2O_2 no sobrenadante (VON ANCKEN, 2020). Note-se que os sobrenadantes tratados com Aspirina 15cH também foram responsivos à Rodanina, embora não exclusivamente. Tal responsividade talvez sinalize a presença de atividade oxidativa decorrente da sucussão em si, somada à atividade oxidativa celular, a partir de macrófagos ativados pelo LPS.

Assim sendo, o corante Rodanina, ao contrário dos demais corantes solvatocrômicos testados, pôde sinalizar ou interagir como sonda para identificação de

atividade oxidativa no meio líquido em diferentes situações. Importante notar que o tempo de exposição do sobrenadante ao veículo sucussionado foi relevante para que os efeitos sobre a Rodanina fossem perceptíveis, o que reforça a hipótese de sinalização de atividade oxidativa do meio, a qual depende de certo tempo para se estabelecer.

Corantes orgânicos à base de Rodanina possuem propriedades aceptoras de elétrons (WAN *et al*., 2017), o que favorece o processo de transferência de prótons e revela sua alta sensibilidade (EL-ZOHRY *et al*., 2020). Além disso, são sondas biocompatíveis, embora também sejam candidatos proficientes para imagens fluorescentes em células vivas e, consequentemente, exprimam alta eficiência quântica e grande potencial para uso diagnóstico (CHRISTOPHER LESLEE *et al*., 2019). Portanto há uma base física de informação molecular, onde há transferência de elétrons impressa em soluções aquosas (JERMAN *et al*., 1999). À medida que produz mudanças de absorbância muito grandes, a Rodanina também pode ser útil para estudar a estrutura e a dinâmica de membranas excitáveis (WAGGONER, 1976). Em células leucêmicas, o uso de Rodanina levou a aumento do nível de produção de espécies reativas de oxigênio (MOORTHY *et al*., 2010), o que é compatível com os achados descritos nesse trabalho.

Em contrapartida, a responsividade à Cumarina de sobrenadantes de macrófagos não desafiados e tratados com a Aspirina 15cH, bem como de sobrenadantes de macrófagos desafiados com LPS e não tratados, pode sinalizar solvatocromismo específico para tais variáveis (LPS e Aspirina 15cH). Curiosamente, ambos mostraram efeitos similares *in vitro* no que diz respeito à ativação macrofágica e a associação de ambos produziu efeito anti-inflamatório paradoxal, corroborando a interação entre eles no contexto celular (VON ANCKEN, 2021). A responsividade do sobrenadante de macrófagos desafiados com LPS à Cumarina, mesmo que não tratados com nenhum insumo dinamizado, sugere a possibilidade de utilização do método desenvolvido por Cartwright também como meio diagnóstico, desde que tais efeitos sejam reproduzidos em estudos sistemáticos e independentes. Esse resultado, portanto, inspira o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa.

A responsividade do corante BDN a sobrenadantes de macrófagos desafiados com LPS e tratados com Aspirina 15cH ou Aspirina 15cH–EF (submetida a correntes elétricas de baixa intensidade) não foi observada em macrófagos desafiados com LPS e não tratados, sugerindo então a especificidade desse corante à Aspirina 15cH, independente da exposição a correntes elétricas.

Quadro 4. Relação de amostras analisadas e os respectivos corantes que apresentaram interação, ou variações na absorbância relativa.

Experimento	**Estímulo desafiante**	**Amostra testada**	**Corante reativo**
Controle sistemático	-	água 1cH	Rodanina
		etanol 0.3% 1cH	Rodanina
Aspirina 15cH	-	Aspirina 15 cH etanol	
		Aspirina 15 cH água	BDN
		Aspirina 15 cH etanol EF	BDN
		Aspirina 15 cH água EF	BDN
	-	SN não desafiado tratado com água 1cH	Rodanina
		SN não desafiado tratado com Aspirina 15cH	Rodanina
		SN não desafiado tratado com Aspirina 15cH	Cumarina
	LPS	SN desafiado com LPS 1µg/ml	Cumarina
		SN desafiado com LPS e tratado com Aspirina 15cH	BDN
		SN desafiado com LPS e tratado com Aspirina 15cH (EF)	BDN
		SN desafiado com LPS e tratado com Aspirina 15cH	Rodanina
		SN desafiado com LPS e tratado com Aspirina 15cH (EF)	Rodanina
Phosphorus *(6, 30, 200cH)*	-	*Phosphorus* 6cH (DHERMUS)	Cumarina
	E cuniculi	SN desafiado com *E. cuniculi* e tratado com etanol 1cH por 24 horas	Rodanina
Silicea terra (6, 30, 200cH)	-	*Silicea terra* 6cH	BDN
		Silicea terra 30cH	BDN
		Silicea terra 30cH	BDN
	BCG	SN desafiado com BCG e tratado com *Silicea terra* 6cH	BDN
		SN desafiado com BCG e tratado com *Silicea terra* 30cH	Violeta metileno
		SN desafiado com BCG e tratado com *Silicea terra* 200cH	Violeta metileno
Zincum metallicum (6, 30, 200cH)	-	*Zincum metallicum* 6cH	BDN
		Zincum metallicum 200cH	BDN
	BCG	SN desafiado com BCG e tratado com *Zincum metallicum* 6cH	Violeta metileno
		SN desafiado com BCG e tratado com *Zincum metallicum* 200cH	Violeta metileno

Tomando-se os dados em conjunto, os efeitos pró-inflamatórios isolados do LPS, da Aspirina 15cH ou da própria água sucussionada apresentaram correspondência com a sinalização pela Cumarina; ao contrário, os efeitos anti-inflamatórios obtidos pela associação de ambos os fatores (quais sejam, o desafio com LPS e o tratamento com Aspirina 15cH) mostram correspondência com a sinalização pelo BDN.

Os corantes amarelos Cumarina e Rodanina apresentaram efeitos inversos em relação à exposição aos sobrenadantes de células desafiadas com LPS, sendo que a Cumarina apresentou aumento na absorbância relativa e a Rodanina mostrou diminuição. Tais oscilações aparentemente opostas não indicam variações quantitativas na interação corante / potência, mas variações qualitativas que expressam diferentes formas de interação, ou seja, diferentes balanços de cargas no solvente estruturado, que podem ser entendidos como variações no momento dipolo do solvente (CARTWRIGHT, 2018; 2020).

O interessante neste fato é que tal efeito qualitativo depende da estrutura particular de cada corante, consequentemente, a alteração estrutural que ocorre no solvente na presença de uma dada amostra implica em variações de cor correspondentes nos corantes solvatocrômicos alí diluídos, sendo que cada um tem sua particularidade. De acordo com Cartwright (2016; 2017), uma potência homeopática que aumentasse a polaridade de qualquer classe de corante inevitavelmente afetaria seus espectros de maneira semelhante àquela observada no aumento da polaridade do solvente. Por exemplo, um corante solvatocrômico negativo tornado mais polar deve exibir um deslocamento hipocrômico no mesmo solvente, enquanto um corante positivamente solvatocrômico tornado mais polar deve exibir um deslocamento batocrômico no mesmo solvente (CARTWRIGHT, 2016). Vale lembrar que o processo de dinamização (diluição + agitação) influencia a natureza de nanoassociados, portanto, as oscilações de absorbância dos corantes pela adição de amostras dinamizadas podem revelar oscilações estruturais do próprio solvente. Assim sendo, o limite de Avogadro (Loschmidt) deixa de ser relevante nesses casos (VAN WASSENHOVEN *et al*., 2018), uma vez que essa constante está associada ao comportamento do soluto e não do solvente.

Tradicionalmente, o Violeta metileno é usado para marcação nuclear, por formar complexos com o DNA (MORRISON *et al*., 1997). A interação do *Phosphorus* 30cH com o corante Violeta metileno observada em APARICIO *et al*., (2020b) não foi reproduzida no presente ensaio. Contudo, há que se considerar as variações de protocolo: no estudo anterior, o corante Violeta metileno foi preparado em água com pH corrigido para 4.9, valor equivalente ao pKa do corante. Em tais condições de preparo, esse corante aumenta muito sua sensibilidade, embora perca especificidade

(CARTWRIGHT, 2017). O presente estudo tem uma abordagem comparativa entre corantes e amostras, nesse caso, foi fundamental que todos os corantes fossem preparados em um mesmo solvente e o álcool absoluto foi o escolhido pelo fato de ser o único solvente polar capaz de solubilizar igualmente todos os corantes estudados. Dessa forma, a aparente contradição de resultados pode ser mera consequência da escolha do solvente em cada situação experimental.

Os medicamentos *Silicea terra* 6 cH, 30 cH e 200 cH e *Zincum metallicum* 6 cH e 200 cH foram marcados pelo corante BDN, apresentando significância estatística em relação ao respectivo veículo. Dentre os SNs de macrófagos desafiados com BCG, somente aquele tratado com *Silicea terra* 6 cH apresentou interação com BDN, enquanto os SNs tratados com *Silicea terra* 30 cH e 200cH apresentaram interação com o Violeta metileno, assim como os SNs de culturas tratadas com *Zincum metallicum* 6cH e 200cH. Tal discrepância de interações da *Silicea terra* 30 cH e 200cH com os corantes BDN e Violeta metileno em função das diferentes amostras mostra certo “arraste” à direita no espectro de luz visível, de forma que o Violeta metileno passou a ser o melhor marcador no caso dos sobrenadantes e o BDN mostrou-se como melhor marcador dos medicamentos. Isso sugere haver pequenas interferências nos padrões de ressonância eletrônica do corante em função da natureza da amostra e de sua capacidade de mudar a polaridade do solvente, ainda que se refiram aos mesmos insumos dinamizados. Inversamente, o *Zincum metallicum* 30 cH não foi responsivo a nenhum dos corantes. Nesse caso, uma nova bateria de testes utilizando outra palheta de corantes seria necessária para identificar um possível marcador. Considerando amiúde os efeitos biológicos da *Silicea terra* e do *Zincum metallicum* em macrófagos RAW 264.7 desafiados com BCG, a *Silicea terra* 6cH está relacionada ao balanço entre IL6 e IL10, a *Silicea terra* 30cH está relacionada a maior internalização de bacilos e degeneração celular e a *Silicea terra* 200cH está relacionada à maior atividade lisossômica, associada a aumento na produção de IL10 e redução na produção de H_2O_2 (PINTO *et al*., 2021b).

Faz-se necessário reforçar que tais associações não podem ser consideradas relações de causa e efeito, mas um primeiro passo ou um indicador consistente de que mais pesquisas devem ser feitas e com técnicas mais específicas, no sentido de validar ou não as hipóteses propostas para a compreensão os mecanismos de ação dos produtos dinamizados, tal como a hipótese da ressonância elétrica / eletrodinâmica quântica (MANZALINI, GALEAZZI, 2019; TOURNIER, 2020).

6. Conclusão

Os corantes solvatocrômicos são considerados marcadores ou “sondas” capazes de indicar a atividade de potências homeopáticas, provavelmente por ressonância elétrica com o solvente. Neste estudo observamos que corantes específicos podem sinalizar potências homeopáticas de diferentes origens, com grau razoável de correspondência entre os medicamentos e as respectivas amostras biológicas tratadas, nesse caso, sobrenadantes de cultura celular.

Conclui-se, portanto, que a Rodanina é um bom marcador de solventes submetidos à sucussão, provavelmente em função da atividade oxidativa associada; Cumarina é marcador de *Phosphorus* 6cH e de sobrenadantes tratados com Aspirina 15 cH e LPS; BDN é marcador de *Silicea terra* 6 cH, 30 cH e 200 cH, *Zincum metallicum* 30 cH e 200cH e Aspirina 15cH; Violeta metileno é marcador de sobrenadantes tratados com *Silicea terra* 30 cH e 200cH, bem como *Zincum metallicum* 6 cH e 200cH. Os demais corantes não apresentaram interações específicas com as amostras estudadas.

7. Conflito de interesses

Não há conflito de interesses relacionado a este projeto.

8. Referências

AGARWAL A, NG, WJ, LIU Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. Chemosphere, 2011; 84(9): 1175–1180. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.

ANUMALA UR, GU J, LO MONTE F, KRAMER T, HEYNY-VON HAUßEN R, HÖLZER J, GOETSCHY-MEYER V, SCHÖN C, MALL G, HILGER I, CZECH C, HERMS J, SCHMIDT B. Fluorescent rhodanine-3-acetic acids visualize neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. Bioorg Med Chem. 2013; 21(17):5139-44. doi: 10.1016/j.bmc.2013.06.039.

APARICIO ACC, DE OLIVEIRA, LHS, SILVA JS, COELHO C P, PINHEIRO, SR, SOUZA, 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. (a)

APARÍCIO ACC, SILVA JS, OLIVEIRA LHS, PINTO SAG, MOTA HMG, SUFFREDINI IB, CARTWRIGHT SJ, BONAMIN LV. Physical-chemical analysis of different homeopathic medicines using solvatochromic dyes as indicators of solvent dipole moment changes. 4th HRI International Homeopathy Research Conference 14-16 June, Cutting Edge Research in Homeopathy. London. 2019. Poster 008. Presentation Abstracts. Homeopathy. 2020; 109(01): A1-A28. doi: 10.1055/s-0040-1702101. (b)

BELL IR, KOITHAN M. A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time-dependent sensitization in a complex adaptive system. BMC Complement Altern Med. 2012; (22); 12:191. doi: 10.1186/1472-6882-12-191.

BELL IR, SCHWARTZ GE. Adaptive network nanomedicine: an integrated model for homeopathic medicine. Front Biosci (Schol Ed) 2013; 5:685–708.

BELL, IR, SARTER, B, KOITHAN, M, BANERJI, P, BANERJI, P, JAIN, S, IVES, J. Integrative Nanomedicine: treating Cancer with Nanoscale Natural Products. Global Advances in Health and medicine. 2014; 3(1), 36–53. doi:10.7453/gahmj.2013.009.

BONAFINI C, MARZOTTO M, BELLAVITE P. In vitro effects of zinc in soluble and homeopathic formulations on macrophages and astrocytes. Homeopathy 2017; 106:103–113.

BONAMIN LV, BELLAVITE P. Immunological models in high dilution research following M Bastide. Homeopathy. 2015; 104(4):263-8. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.004.

BONAMIN LV. Descobrindo como a homeopatia funciona. 1ª Ed. São Bernardo do Campo, 2016. 74p. ISBN 978-85-921613-0-9. Disponível em www.biodilutions.com. Acessado em Nov. 22, 2021.

BONAMIN, LV. A solidez da pesquisa básica em homeopatia. Revista de Homeopatia. 2017; 80(1/2): 89-97.

BONAMIN LV, PEDRO RRP, MOTA HMG, AGUIAR MSC, PINTO SAG, DE SOUZA J, DE OLIVEIRA LHS, APARICIO AC, PERES GB, SUFFREDINI IB, 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.

BRACCINI GL. Resposta morfofuncional em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso do Núcleo Homeopático Homeopatila 100®. 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá. http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/1621.

BRACCINI GL. CASETTA J. SILVA SCC. CARNIATTO CHO. SANTOS VDR. COSTA VF Aplicação Da Homeopatia Na Produção Animal. Revista Valore - Volta Redonda. 2019; 4 (Edição Especial): 310-323.

BRASIL, Anvisa. Farmacopéia Homeopática Brasileira, 2011, 3 ed., 364 p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259147/3a_edicao.pdf/cb9d5888-6b7c- 447b-be3c-af51aaae7ea8. Acessado em Nov. 22, 2021.

BRASIL, Anvisa. Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira - 1ª edição. 2017. Versão eletrônica 1.0 publicada no site em 10 de outubro de 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br. Acessado em Nov. 22, 2021.

CALLIS PR. Electrochromism and solvatochromism in fluorescence response of organic dyes: a nanoscopic view. In: Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology. Heidelberg: Springer. 2010; 309–330.

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

CARTWRIGHT SJ. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchsone. Part 1: pH studies. Homeopathy. 2017; 106(1):37-46. doi: 10.1016/j.homp.2017.01.00

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

CARTWRIGHT SJ. Using the unique spectroscopic properties of push-pull molecular systems to investigate homeopathic potencies. In: BONAMIN LV. WAISSE S. eds. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research. Signals and Images GIRI Series. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing. 2019. p.104-127. 287.

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

CALABRESE EJ, GIORDANO J. Ultra low doses and biological amplification: Approaching Avogadro's number. Pharmacol Res. 2021; 170:105738. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105738.

COMPRI-NARDY M., STELLA M.B., OLIVEIRA C. Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009. 200 p.

CASALI, VWD. ANDRADE FMC. CUPERTINO, MC. Homeopatia, Agroecologia e Sustentabilidade. Revista Brasileira de Agroecologia. 2011; 6. Disponível em: http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/7693 Acessado em Junho 22, 2021.

CAVALARO V, GONSALES DS, SOUZA MSA, TRINDADE CB, OLIVEIRA CR. In vitro study activity proliferative fibroblast human submitted to treatment Zincum metallicum and Calendula officinalis in homeopathic ultra-dilutions. International Journal of High Dilution Research. 2017; 16(1):7-19.

CHATTOPADHYAY R. MAHATA CR. A Fundamental Study to Observe Correlation at Molecular Level between Bio-Samples of Patients and Indicated Homoeopathic Medicines. International Journal of High Dilution Research. 2016; 1515(33):11-17.

CHRISTOPHER LESLEE DB, KARUPPANNAN S, KARMEGAM MV, GANDHI S, SUBRAMANIAN S. A Fluorescent Turn-On Carbazole-Rhodanine Based Sensor for Detection of Ag+ Ions and Application in Ag+ Ions Imaging in Cancer Cells. J Fluoresc. 2019; 29(1):75-89. doi: 10.1007/s10895-018-2312-6.

COIMBRA MELO EN. Efeito protetor do isoterápico sobre a eclosão de cistos de *Artemia salina* intoxicadas com arseniato de sódio [PhD thesis]. São Paulo: Graduation Program on Environmental and Experimental Pathology, Universidade Paulista—UNIP; 2020.

COSTA NC. ARAÚJO RL. FREITAS GBL. Homeopatia: Um Campo Terapêutico Fundamental No Cuidado Veterinário De Animais de Produção. Revista Salus-Guarapuava (PR). 2009; 3(2): 75-89.

DALBONI LC, COELHO CP, PALOMBO PEDRO RR, CORREIA MS, DE SANTANA FR, CARDOSO TN, PINTO SAG, ALVARES-SARAIVA AM, DUTRA-CORREA M, PERES GB, HOLANDINO C, ROSSI A, CÉSAR AT, WAISSE S, BONAMIN LV. Biological Actions, Electrical Conductance and Silicon-Containing Microparticles of Arsenicum Album Prepared in Plastic and Glass Vials. Homeopathy. 2019; 108(1):12-23. doi: 10.1055/s-0038-1670675.

DE SANTANA FR, DALBONI LC, NASCIMENTO KF, KONNO FT, ALVARES-SARAIVA AM, CORREIA MS, BOMFIM MD, CASARIN RC, PEREZ EC, LALLO MA, PERES GB, LAURENTI MD, BENITES NR, BUCHI DF, BONAMIN LV. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - *Leishmania (L.) amazonensis* interaction in vitro. Cytokine. 2017, 92, 33-47. doi: 10.1016/j.cyto.2017.01.004.

DEL GUIDICE E, DOGLIA S, MILANI M, VITIELLO G. Coherence of electromagnetic radiation in biological systems. Cell Biophys. 1988; 13(3):221-4. doi: 10.1007/BF02918379.

DEL GIUDICE E, DE FILIPPIS A, DEL GIUDICE N, DEL GIUDICE M, D'ELIA I, IRIDE L, MENGHI E, TEDESCHI A, COZZA V, ADONE B, TUFANO MA. Evaluation of a method based on coherence in aqueous systems and resonance-based isotherapeutic remedy in the treatment of chronic psoriasis vulgaris. Curr Top Med Chem. 2015; 15(6):542-8.

DEMANGEAT JL. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. Homeopathy 2015; 104: 101-115.

DEMANGEAT JL. Towards a Rational Insight into the Paradox of Homeopathy. Adv Complement Alt Med. 2018; 2(2): ACAM.000534.

DOUGHERTY RC. HOWARD LN. Equilibrium structural model of liquid water: Evidence from heat capacity, spectra, density, and other properties. The Journal of Chemical Physics. 1998; 109(17), 7379–7393. doi:10.1063/1.477344.

EIZAYAGA JE, WAISSE S, RUTTEN L, KLEIN-LAANSMA C, MOTURA A. Prevalence and likelihood ratio of six objective signs among good responders to Natrum muriaticum: Multi-centre observational assessment. Homeopathy 2021; 110:36–41.

ELIA V, AUSANIO G, GENTILE F, GERMANO R, NAPOLI E, NICCOLI M. Experimental evidence of stable water nanostructures in extremely dilute solutions, at standard pressure and temperature. Homeopathy. 2014;103(1):44-50. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.004.

ELIA V, NICCOLI M. New Physico-Chemical Properties of Extremely Diluted Aqueous Solutions. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2004; 75(3), 815–836. doi:10.1023/b:jtan.0000027178.11665.8f

EL-ZOHRY AM, AGRAWAL S, DE ANGELIS F, PASTORE M, ZIETZ B. Critical Role of Protons for Emission Quenching of Indoline Dyes in Solution and on Semiconductor Surfaces. J Phys Chem C Nanomater Interfaces. 2020; 124(39):21346-21356. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c07099.

ENDLER P, THIEVES K, REICH C, MATTHIESSEN P, BONAMIN L, SCHERR C, BAUMGARTNER S. Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10^{-23}: a bibliometric study. Homeopathy. 2010; 99(1), 25–36. doi:10.1016/j.homp.2009.11.008.

ENDLER PC, SCHERER-PONGRATZ W, HARRER B, LINGG G, LOTHALLER H. Amphibians and ultra- high diluted thyroxine – further experiments and re-analysis of data. Homeopathy. 2015; 104(4), 250–256. doi:10.1016/j.homp.2015.10.001.

FOLETTI A, LEDDA M, GRIMALDI S, EMILIA E, LIVIO G, LIBOFF A, LISI A. The trail from quantum electro dynamics to informative medicine. Electromagnetic Biology and medicine. 2015; 34(2): 147-150. doi: 10.3109/15368378.2015.1036073.

FONTES, Olney Leite. Farmácia homeopática: teoria e prática. 5 ed. Barueri: Manole, 2018.

FUZINATTO MM. ANDRETTO AP. BRACCINI GL. ALVES MM. VISENTAINER JV. VARGAS L. Efeito do produto homeopático HomeoAqua mega 3® no desempenho e no perfil lipídico da cabeça de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ciência Animal Brasileira. 2019; 20. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-50241. Acessado em Nov. 22, 2021.

GONÇALVES JP, DOS SANTOS MLF, ROSSI GR, COSTA GAGOSIAN VS, DE OLIVEIRA CC. Differential effects of Zincum metallicum on cell models. Homeopathy. 2017; 106(3):171-180. doi: 10.1016/j.homp.2017.02.004.

GUEDES JRP, BONAMIN LV, CAPELOZZI VL. Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses. Homeopathy. 2018; 107(03): 172-180. doi: 10.1055/s-0038-1642055.

JERMAN I, BERDEN M, SKARJA M. Instrumental measurements of different homeopathic dilutions of potassium iodide in water. Acupunct Electrother Res. 1999; 24(1):29-44. doi: 10.3727/036012999816356462.

KEMP DD, GORDON MS. An Interpretation of the Enhancement of the Water Dipole Moment Due to the Presence of Other Water Molecules. The Journal of Physical Chemistry A, 2008: 112(22), 4885–4894. doi:10.1021/jp801921f.

KLEIN SD, WÜRTENBERGER S, WOLF U, BAUMGARTNER S, TOURNIER A. Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis-Part 1. J Altern Complement Med. 2018; 24(5):409-421. doi: 10.1089/acm.2017.0249.

KLYMCHENKO AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. Acc Chem Res. 2017; 50(2):366-375. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00517.

KONAR A, SARKAR T, CHAKRABORTY I, SUKUL NC, MAJUMDAR D, SINGHA A, SUKUL A. Raman spectroscopy reveals variation in free OH groups and hydrogen bond strength in ultrahigh dilutions. International Journal of High Dilution Research. 2016; 15(2):2-9.

KRITHIKA U, PRABITHA P, MANDAL SP, YUVARAJ S, PRIYA D, WADHWANI AD, PRASHANTHA KUMAR BR. Development of Novel Rhodanine Analogs as Anticancer Agents: Design, Synthesis, Evaluation and CoMSIA Study. Med Chem. 2021; 17(3):216-229. doi: 10.2174/1573406416666200610191002.

MAITY T, MAHATA CR. Succussed Serial Dilutions in Water Carry Solute Information via Solute-Specific Water Structures-A Theory Based on Quantum Electrodynamics. Homeopathy. 2021; 110(4):277-282. doi: 10.1055/s-0041-1726007.

MAHATA CR. Quantum electro-dynamics helps homoeopathy achieve its scientific basis (paving the way for a generalized concept of medicine). Int J High Dilution Res. 2017;16(2): 05-10.

MAHATA CR. Dielectric dispersion studies of some potentised homeopathic medicines reveal structured vehicle. Homeopathy. 2013; 102(4): 262-7. doi: 10.1016/j.homp.2013.07.003.

MANZALINI A, GALEAZZI B. Explaining Homeopathy with Quantum Electrodynamics. Homeopathy. 2019; 108(3):169-176. doi: 10.1055/s-0039-1681037.

MARZOTTO M, OLIOSO D, BRIZZI M, TONONI P, CRISTOFOLETTI M, BELLAVITE P. Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of Gelsemium sempervirens. BMC Complement Altern Med. 2014; 19(14)104. doi: 10.1186/1472-6882-14-104.

MATHIE RT. Homeopathy's Global Research Influence. Homeopathy. 2021; 110(1):1. doi: 10.1055/s-0040-1722748.

MONDAL J, SAMADDER A, KHUDA-BUKHSH AR. Psorinum 6 × triggers apoptosis signals in human lung cancer cells. J Integr Med. 2016; 14(2):143-53. doi: 10.1016/S2095-4964(16)60230-3.

MONTAGNIER L, AÏSSA J, CAPOLUPO A, CRADDOCK TJA, KURIAN P, LAVALLEE C, POLCARI A, ROMANO P, TEDESCHI A, VITIELLO G. Water Bridging Dynamics of Polymerase Chain Reaction in the Gauge Theory Paradigm of Quantum Fields. Water. 2017; 9: 339. doi:10.3390/w9050339.

MONTAGNIER L, DEL GIUDICE E, AÏSSA J, LAVALLEE C, MOTSCHWILLER S, CAPOLUPO A, POLCARI A, ROMANO P, TEDESCHI A, VITIELLO G. Transduction of DNA information through water and electromagnetic waves. Electromagn Biol Med. 2015; 34:106–112.

MOORE AR, COFFEY E, HAMAR D. Diagnostic accuracy of Wright-Giemsa and rhodanine stain protocols for detection and semi-quantitative grading of copper in canine liver aspirates. Vet Clin Pathol. 2016; 45(4):689-697. doi: 10.1111/vcp.12401. Erratum in: Vet Clin Pathol. 2017; 46(2):381.

MOORTHY BT, RAVI S, SRIVASTAVA M, CHIRUVELLA KK, HEMLAL H, JOY O, RAGHAVAN SC. Novel rhodanine derivatives induce growth inhibition followed by apoptosis. Bioorg Med Chem Lett. 2010; 20(21):6297-301. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.084.

MORRISON H, MOHAMMAD T, KURUKULASURIYA R. Photobiological properties of methylene violet. Photochem Photobiol. 1997; 66(2):245-52. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08650.x.

MOTA, HMG, APARICIO AC, OLIVEIRA LH, PEDRO RRP, PINTO SAG, DE SANTANA FR, SUFFREDINI IB, CARTWRIGHT SJ, BONAMIN LV. Cartwright's Method as a Physico-chemical Marker of Antimonium Crudum Biological Effect. Int J High Dilution Res. 2018; 17(2):14-14.

NAGAI MY, DALBONI LC, CARDOSO TN, CORREIA MS, PINTO SAG, PINTO AAG, COELHO CP, ALVAREZ-SARAIVA A, PERES GB, LALLO MA, BONAMIN LV. Effects of Homeopathic Phosphorus on *Encephalitozoon cuniculi*-Infected Macrophages In-Vitro. Homeopathy 2019; 108(03): 188-200. doi: 10.1055/s-0039-1678700.

NAGAI MY. Remediação dos efeitos do glifosato sobre *Artemia Salina* por isoterápico. Tese apresentada ao Curso de pósgraduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista – UNIP, Dissertação (Doutora) em Patologia Ambiental e Experimenta da Universidade Paulista – UNIP, São Paulo-SP, 2021. 93 pg.

NASCIMENTO KF, DE SANTANA FR, COSTA CRV, KAPLUM V, VOLPATO H, NAKAMURA CV, BONAMIN LV, FREITAS BUCHI D. M1 homeopathic complex trigger effective responses against *Leishmania (L) amazonensis in vivo* and *in vitro*. Cytokine. 2017; 99:80-90. doi: 10.1016/j.cyto.2017.07.001.

OLIOSO D, MARZOTTO M, MORATTI E, BRIZZI M, BELLAVITE P. Effects of Gelsemium sempervirens L. on pathway-focused gene expression profiling in neuronal cells. J Ethnopharmacol. 2014; 153(2):535-9. doi: 10.1016/j.jep.2014.02.048.

OLIOSO D, MARZOTTO M, BONAFINI C, BRIZZI M, BELLAVITE P. *Arnica montana* effects on gene expression in a human macrophage cell line. Evaluation by quantitative Real-Time PCR. Homeopathy 2016; 105(2):131-47. doi: 10.1016/j.homp.2016.02.001.

OLIVEIRA SM, DE OLIVEIRA CC, ABUD AP, GUIMARÃES FDE S, DI BERNARDI RP, COLETTO EL, BUCHI DF. *Mercurius solubilis*: actions on macrophages. Homeopathy 2011; 100(4): 228-36. doi: 10.1016/j.homp.2011.05.005.

OLIVEIRA ERN, VIEGAS EMM. Qualidade do Pescado. *In*: RANZANI PAIVA MJT. TAKEMOTO RM. LIZAMA MAP. Sanidade de organismos aquáticos São Paulo: Livraria Varela, p. 415 426. 2004.

ONO M, HAYASHI S, MATSUMURA K, KIMURA H, OKAMOTO Y, IHARA M, TAKAHASHI R, MORI H, SAJI H. Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer's brains. ACS Chem Neurosci. 2011; 2(5):269-75. doi: 10.1021/cn200002t.

PAIXÃO JLF, PRATA MCA, FURLONG J, TASSINARI WS, BITTENCOURT VREP, PIRES MFA, ANGELO IC. Assessment of weight gain and control of parasitism by *Rhipicephalus microplus* in dairy cattle in the field using organosynthetic parasiticide, phytotherapics and homeopathy. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2021; 73 (5): 1001-1013. doi: 10.1590/1678-4162-12359.

PINTO AAG, NAGAI MYO, COIMBRA EN, MOHAMMAD SN, SILVA JS, VON ANCKEN A, PINTO SAG, AGUIAR MS, DUTRA-CORREA M, HORTELLANI MA, MIRANDA A, SARKIS JES, SUFFREDINI IB, PERES GB, BERNARDI MM, CARTWRIGHT SJ, BONAMIN LV. Bioresilience to Mercury Chloride of the Brine Shrimp *Artemia Salina* after Treatment with Homeopathic Mercurius Corrosivus. Homeopathy. 2021; 110(4):244-255. doi: 10.1055/s-0041-1729562. (a)

PINTO SAG, NAGAI MYO, ALVARES-SARAIVA A, PERES GB, WAISSE S, PEREZ EC, BONAMIN LV. Silicea terra and Zincum metallicum Modulate the Activity of Macrophages Challenged with BCG In Vitro. Homeopathy. 2021; 110(1):52-61. doi: 10.1055/s-0040-1716367. (b)

PINTO LF; DE ALMEIDA BM. O contexto da homeopatia na pecuária orgânica no Brasil. Homeopatia Brasileira. 2002; 8:23-28.

POLLACK GH. The Fourth Phase of Water – Beyond Solid, Liquid, and Vapor. 1a ed. Seattle: Ebner & Sons Publishers. 2013. 357p.

RAMPRASAD M; BHATTACHARYYA SP. Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications. Project: Intramolecular Charge Transfer (ICT). Weinheim: Wiley-VCH; 2018. 38p. doi: 10.1002/9783527801916.

RATH SS. PRIYADARSHINI N. HEANKHE K. A review on scope of homeopathy in aquaculture for a nourishing future. J. Inf. Mol. Biol. 2018; 6(1)16-21.

REAL, C. M. Homeopatia populacional - Fundamentos, ruptura de um paradigma. A Hora Veterinária. 2008; 28 (164): 13-20.

REICHARDT, C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry 2ª ed.,VCH: Weinheim, 1988. 534p.

REICHARDT C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: some new findings. Pure Appl Chem 2008; 80(7): 1415-432.

REICHARDT C, WELTON T. Solvent effects on the absorption spectra of organic compounds. In: Solvents and solvent effects in organic chemistry. 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. p. 359-424.

RESENDE JM. Caderno de Homeopatia. Instruções práticas geradas por agricultores sobre o uso da homeopatia no meio rural. Departamento de Fitotecnia Centro de Ciências Agrárias Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – Minas Gerais. Brasil 3ª Edição. 2010. Disponível em: http://www.ccs.ufpb.br/nephf/contents/documentos/livros/homeopatia/caderno-de-homeopatia-instrucoes-praticas-geradas-por-agricultores-sobre-o-uso-da-homeopatia-no-meio-rural/view. Acessado em: 12/06/2020.

RODRIGUES DE SANTANA F, DE PAULA COELHO C, CARDOSO TN, PEREZ HURTADO EC, ROBERTI BENITES N, DALASTRA LAURENTI M, VILLANO BONAMIN L. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. Homeopathy. 2014; 103(4):264-74. doi: 10.1016/j.homp.2014.08.006.

RUTTEN L, EIZAYAGA J, KAUR H, LAMBA CD, SACHDEVA J, KHURANA A, OBERAI P, MANCHANDA R, RAIZADA S, CHAUDHARY S, SHINDE V, RAMANAN VE, KUNDU C, PAL PP, KIRAANMAYEE RG, SAHOO AR, RAJESHEKHAR B, SHIL RC, MAHAJAN N. Counting polar symptoms: How to represent results? Homeopathy 2021; 110: 27–35.

SAGAR, SS; CHAVAN, RP; PATIL CL, SHINDE, DN KEKANE, SS Physico-chemical parameters for testing of water - A review. International Journal of Chemical Studies 2015; 3(4): 24-28.

SCHMIDT JM. Sustainability as a challenge to therapeutics - The Hahnemannian and Gandhian approach. Explore (NY). 2020; 16(4):237-241. doi: 10.1016/j.explore.2019.11.009.

SCHULTE J; ENDLER P C. Update on preliminar elements of a theory of ultra-high dilutions. Homeopathy 2015; 104(4):337-42. doi: 10.1016/j.homp.2015.09.010.

SILVA, J B. Farmacotécnica Homeopática Simplificada. 2ª Edição. São Paulo: Robe, 1997. 321p.

SIENA CE. NATALI MRM. BRACCINI GL. OLIVEIRA AC. RIBEIRO RP. VARGAS L. Efeito do núcleo homeopático homeopatila 100® na eficiência produtiva em alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Semina. Ciências Agrárias, - Londrina. 2010; 31(4): 985-994.

SIQUEIRA CM, COSTA B, AMORIM AM, GONÇALVES M, FÉO DA VEIGA V, CASTELO-BRANCO M, TAKYIA C, ZANCAN P, CÂMARA FP, COUCEIRO JN, HOLANDINO C. H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. Homeopathy. 2013; 02(1): 31-40. doi: 10.1016/j.homp.2012.10.003.

SMITH CW. Electromagnetic and magnetic vector potential bioinformation and water. Homeopathy. 2015; 104(4):301-4. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.006.

SOUZA, M. F. A. Homeopatia Veterinária. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1. 2002. Anais. Corumbá: Embrapa Pantanal; Concórdia, SC: Universidade do Contestado, 2002. p. 1-4.

SUKUL NC, SUKUL A. Exploration of the physical basis of high dilutions by Raman and fluorescence spectroscopy and calorimetry. In: Bonamin LV, Waisse S, eds. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research. Signals and Images GIRI Series. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing; 2019: 82–94.

SUPPAN P, GHONEIM N. Solvatochromism, 1a ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1997, 272p.

TAKAHASHI M, CHIBA K, LI P. Free-Radical Generation from Collapsing Microbubbles in the Absence of a Dynamic Stimulus. The Journal of Physical Chemistry B, 2007: 111(6), 1343–1347. doi:10.1021/jp0669254.

TOURNIER A, KLEIN SD, WÜRTENBERGER S, WOLF U, BAUMGARTNER S. Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis-Part 2. J Altern Complement Med. 2019; 25(9):890-901. doi: 10.1089/acm.2019.0064.

TOURNIER AL. Is Homeopathy Really That Implausible? In: BONAMIN LV; WAISSE S. eds. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research. Signal and Images GIRI Series Cambridge Scholars Publishing, 2019. p.46-67.

TOURNIER A, WÜRTENBERGER S, KLEIN SD, BAUMGARTNER S. Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis-Part 3. J Altern Complement Med. 2021; 27(1):45-57. doi: 10.1089/acm.2020.0243.

ULLMAN D. Exploring Possible Mechanisms of Hormesis and Homeopathy in the Light of Nanopharmacology and Ultra-High Dilutions. Dose Response. 2021; 19(2):15593258211022983. doi: 10.1177/15593258211022983.

VALENTIM-ZABOTT M, VARGAS L, RIBEIRO RP, PIAU R JR, TORRES MB, RÖNNAU M, SOUZA JC. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. Homeopathy. 2008; 97(4):190-5. doi: 10.1016/j.homp.2008.08.007.

VAN WASSENHOVEN M, GOYENS M, CAPIEAUX E, DEVOS P, DORFMAN P Nanoparticle Characterization of Traditional Homeopathically Manufactured Cuprum metallicum and Gelsemium sempervirens medicines and controls Homeopathy 2018; 107:244–263. doi:10.1055/s-0038-1666864.

VAN WASSENHOVEN M, GOYENS M, HENRY M, CUMPS J, DEVOS P. Verification of nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured metal (Cuprum metallicum) and plant (Gelsemium sempervirens) medicines and controls. Homeopathy. 2021; 110:42–51.

VARGAS L. Efeito da vitamina C, da vitamina E, do cloreto de sódio e da formalina na ocorrência de ectoparasitos em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L). In: RANZANI PAIVA, MJT. TAKEMOTO RM. LIZAMA MAP. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Livraria Varela, 2004. p. 371-382.

VERDEL N, JERMAN I, KRASOVEC R, BUKOVEC P, ZUPANCIC M. Possible time-dependent effect of ions and hydrophilic surfaces on the electrical conductivity of aqueous solutions. Int J Mol Sci 2012; 13:4048–4068. doi: 10.3390/ijms13044048.

VON ANCKEN, ACB. Regulação da atividade macrofágica pela aspirina 15 cH *in vitro*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental. São Paulo, 2021, 85p.

WADA T, NAKANO H, SATO H. Solvatochromic Shift of Brooker's Merocyanine: Hartree–Fock Exchange in Time Dependent Density Functional Calculation and Hydrogen Bonding Effect. Journal of Chemical Theory and Computation, 2014; 10(10), 4535–4547. doi:10.1021/ct5004884.

WAISSE S, BONAMIN LV. Explanatory Models for Homeopathy Part 2: Critical Review and the State of the Art. In: BONAMIN LV; WAISSE S. eds. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research. Signal and Images GIRI Series Cambridge Scholars Publishing, 2019. p. 2-25.

XU XF, KAHAN A, ZILBERG S, HAAS Y. Photoreactivity of a push-pull merocyanine in static electric fields: a three-state model of isomerization reactions involving conical intersections. J Phys Chem A. 2009; 113:9779–9791.

WAGGONER A. Optical probes of membrane potential. J Membr Biol. 1976; 27(4):317-34. doi: 10.1007/BF01869143.

WAN Z, JIA C, WANG Y, YAO X. A Strategy To Boost the Efficiency of Rhodanine Electron Acceptor for Organic Dye: From Nonconjugation to Conjugation. ACS Appl Mater Interfaces. 2017; 9(30):25225-25231. doi: 10.1021/acsami.7b04233.

YINNON T. Very Dilute Aqueous Solutions—Structural and Electromagnetic Phenomena. Water. 2017; 9:28–66. doi: 10.14294/WATER.2017.4

YINNON TA, YINNON CA. Electric Dipole Aggregates In Very Dilute Polar Liquids: Theory And Experimental Evidence. International Journal of Modern Physics B, 2011; 25(28), 3707–3743. doi:10.1142/s0217979211101624.

ZANCO JJ, BOFF P, DOMINGUES S, BOFF MIC. Captação de microvibrações da imagem para identificação de sinais de homeopatia em plantas. VI Simpósio Internacional Ciências, Saúde e Território "Saúde única: Desafios e Perspectivas". 25 a 27 de maio de 2021. Disponível em: http://www.simposioppgas.com.br/trabalhos2605.php. Acessado em Nov. 22, 2021.

Material suplementar 1. Tabela demonstrativa referente ao estudo da interação de corantes solvatocrômicos como marcadores em amostras de controles, medicamentos e sobrenadantes desafiados e tratados com medicamentos dinamizados. CONT SIST = controle sistemático; CONT SIST ASP = controle sistemático Aspirina; MED = medicamento; SN = sobrenadante.

Grupos	Parâmetros	BDN	COUMARINA	NNDMIA	RODANINA	VM	RED NILE
CONT SIST	WATER						
CONT SIST	SUCC WATER						
CONT SIST	VEHICLE (HA 30)						
CONT SIST	SUCC VEHICLE (HA 30)						
CONT SIST ASP	LPS						
CONT SIST ASP	LPS + WATER						
CONT SIST ASP	LPS + SUCC WATER						
CONT SIST ASP	SUCC WATER						
MED	ETHANOL 30%						
MED	ASP 15 cH ETH						
MED	ASP 15 cH WAT						
MED	ASP 15 cH ETH EF						
MED	ASP 15 cH WAT EF						
SN	UNCHALLENGED (MO)						
SN	SUCC WATER						
SN	LPS						
SN	ASP 15 cH						
SN	LPS + ASP 15 cH						
SN	LPS + ASP 15 cH (EF)						
SN	LPS + SUCC WATER						
SN	LPS + ASP 200 µG						
MED	ETHANOL 30%						
MED	PHOS 6 cH						
MED	PHOS 30 cH						
MED	PHOS 200 cH						
SN 1 Hr	MO + SUCC WAT						
SN 1 Hr	VEHICLE						
SN 1 Hr	PHOS 6 cH						
SN 1 Hr	PHOS 30 cH						
SN 1 Hr	PHOS 200 cH						
SN 24 Hrs	MO + E CUN						

SN 24 Hrs	MO + SUCC WAT						
SN 24 Hrs	VEHICLE						
SN 24 Hrs	PHOS 6 cH						
SN 24 Hrs	PHOS 30 cH						
SN 24 Hrs	PHOS 200 cH						
MED	VEHICLE						
MED	SIL 6 cH						
MED	SIL 30 cH						
MED	SIL 200 cH						
MED	VEHICLE						
MED	ZINC 6 cH						
MED	ZINC 30 cH						
MED	ZINC 200 cH						
SN	MO						
SN	VEHICLE						
SN	SIL 6 cH						
SN	SIL 30 cH						
SN	SIL 200 cH						
SN	MO						
SN	VEHICLE						
SN	ZINC 6 cH						
SN	ZINC 30 cH						
SN	ZINC 200 cH						
Grupos	Parâmetros	BDN	COUMARINA	NNDMIA	RODANINA	VM	RED NILE

Siglas e abreviaturas estão inseridas na lista, páginas 7 e 8.

Material suplementar 2. Tabela de resultados obtidos da interação de corantes solvatocrômicos com amostras de medicamentos, SNs biológicos e controles do presente estudo correlacionadas à dados de amostras de estudos anteriores.

Referência	*Amostras*	*Positividade a Corantes Solvato-crômicos*	*Comprimento de onda (nm)*	*Atividade biológica em macrófagos*				
				Mediador	*Fagocitose*	*Atividade lisossômica*	*H_2O_2*	*Spreading*
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SC WATER**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SC SUCC WAT**	**RODANINA**	**446**					
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SC VEHICLE (HA 30)**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SC SUCC VEHICLE (HA 30)**	**RODANINA**	**446**					
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (SIL) MO**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (SIL) VEHICLE**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (SIL) SIL 6 cH**	**BDN**	**482**	**IL6 ; IL10**	**<**			
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (SIL) SIL 30 cH**	**VM**	**557**		***>**			
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (SIL) SIL 200 cH**	**VM**	**482 ; 596**	**IL10**	**>**	**#>**	***↓**	
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED SIL) VEHICLE**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED SIL) SIL 6 cH**	**BDN**	**482**					
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED SIL) SIL 30 cH**	**BDN**	**482**					
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED SIL) SIL 200 cH**	**BDN**	**482**					
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (ZINC) - MO**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (ZINC) - VEHICLE**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (ZINC) – ZINC 6 cH**	**VM**	**557**		***<**	***>**		
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (ZINC) – ZINC 30 cH**				**>**	***>**		
[PINTO *et al.*, 2021b]	**SN (ZINC) – ZINC 200 cH**	**VM**	**557**	**NÃO**	***<**	***>**		
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED ZINC) VEHICLE**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED ZINC) ZINC**	**BDN**	**482**					

	6 cH							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED ZINC) ZINC 30 cH**							
[PINTO *et al.*, 2021b]	**(MED ZINC) ZINC 200 cH**	**BDN**	**482**					
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 1h) SUCC WAT**							
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 1h) VEHICLE**				**<**			
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 1h) PHOS 6 cH**				**<**	**<**		
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 1h) PHOS 30 cH**				**<**	**<**		
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 1h) PHOS 200 cH**			**Rantes**		**<**		
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) MO + E CUN**							
[PINTO *et al.*, 2021b; NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) SUCC WAT**	**RODANINA**	**446**					
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) VEHICLE**				**<**			
[PINTO *et al.*, 2021b; NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) PHOS 6 cH**				**<**			
[NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) PHOS 30 cH**				**<**			
[PINTO *et al.*, 2021b; NAGAI MY, 2019]	**SN (PHOS 24h) PHOS 200 cH**				**<**	**<**		
[NAGAI MY, 2019]	**(MED DHERMUS) ETHANOL 30%**							
[PINTO *et al.*, 2021b; NAGAI MY, 2019]	**(MED DHERMUS) PHOS 6 cH**	**CUMARINA**	**482**					
[NAGAI MY, 2019]	**(MED DHERMUS) PHOS 30 cH**							
[NAGAI MY, 2019]	**(MED DHERMUS) PHOS 200 cH**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(MED HN) ETHANOL 30%**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(MED HN) ETHANOL 30% SUCC**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(MED HN) PHOS 6 cH**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(MED HN) PHOS 12 cH**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(MED HN) PHOS 30 cH**							

[PINTO *et al.*, 2021b)	**(SC ASP) LPS**	**CUMARINA**		**IL6**			**↓ (↑NO)**	**↑**
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(SC ASP) LPS + WATER**							
[PINTO *et al.*, 2021b)	**(SC ASP) LPS + SUCC WATER**							
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SC ASP) SUCC WATER**	**RODANINA**	**432 ; 446**	**IL-10; TNFα**			**↓**	**↑**
[VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) UNCHALLENGED (MO)**							
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) SUCC WATER**	**RODANINA**	**446**					
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) LPS**	**CUMARINA**						
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) ASP 15 cH**	**CUMARINA**	**432 ; 446**				**↑**	**↑**
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) LPS + ASP 15 cH**		**482 ; 446**					
[PINTO *et al.*, 2021b; VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) LPS + ASP 15 cH (EF)**		**482 ; 446**					
[VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) LPS + SUCC WATER**							
[VON ANCKEN ACB. 2021]	**(SN ASP) LPS + ASP 200 µg**			**IL-10; TNFα**			**↓**	**↓**
Referência	***Amostras***	***Corantes Solvatocrômicos***	***Desnsidade óptica (nm)***	***mediadores***	***Fagocitose***	***Atividd lisossomal***	***H_2O_2***	***Spreading***

Siglas e abreviaturas estão inseridas na lista, páginas 7 e 8.