



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação *in vitro* da Eficácia de Produtos
Homeopáticos contendo *Momordica
charantia* através de Bioensaios.**

REGINA CARMEN ESPÓSITO

NATAL

2013

REGINA CARMEN ESPÓSITO

Avaliação *in vitro* da Eficácia de Produtos Homeopáticos contendo *Momordica charantia* através de Bioensaios.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha

NATAL
2013

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Esposito, Regina Carmen.

Avaliação in vitro da Eficácia de Produtos Homeopáticos contendo
Momordica charantia através de Bioensaios / Regina Carmen Esposito.
- Natal, 2013.
102f. il.

Orientador: Cícero Flávio Soares Aragão.

Coorientador: Hugo Alexandre Oliveira Rocha.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas da UFRN, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

1. Homeopatia - Dissertação. 2. Momordica charantia - Dissertação.
3. Ensaios biológicos in vitro - Dissertação. 4. Citotoxicidade -
Dissertação. 5. Citocinas - Dissertação. 6. Controle de qualidade -
Dissertação. I. Aragão, Cícero Flávio Soares. II. Rocha, Hugo
Alexandre Oliveira. III. Título.

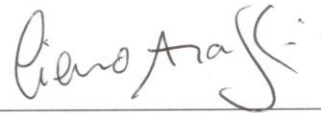
RN/UF/BSA01

CDU 615.015.32

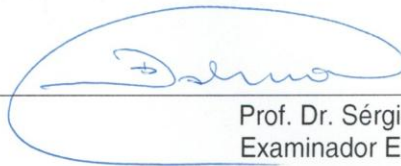
Regina Carmen Espósito

**Avaliação *in vitro* da Eficácia de Produtos Homeopáticos
contendo *Momordica charantia* através de Bioensaios.**

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão
Presidente – UFRN



Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora
Examinador Externo – UFSM



Profa. Dra. Valéria Soraya de Farias Sales
Examinador Interno – UFRN



Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha
Examinador Interno – UFRN

Natal, 25 de março de 2013

Dedico este trabalho a todos que acreditam na terapêutica homeopática como uma opção de tratamento da arte de curar.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelo dom da minha vida e por ter me concedido saúde e motivação para a conclusão deste Mestrado.

Aos meus pais, Antônio Espósito e Maria da Conceição Terra Espósito, que me ensinaram os verdadeiros valores da vida e sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos.

Ao meu esposo, Murilo Paiva Lopes, sempre ao meu lado me estimulando a superar as dificuldades para elaboração deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão, pela amizade, confiança e pelo zelo profissional na minha formação de mestre.

Ao co-orientador Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, por seu carinho de amigo e mestre e por abrir as portas do seu laboratório e equipe permitindo a execução deste trabalho.

Ao Prof. Msc. Marco Vinicius Monteiro Navarro, pelo incentivo nos estudos da homeopatia.

Aos colaboradores Prof.^a Dr^a Louisianny Guerra da Rocha, Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Junior pela contribuição para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Especialista Idivaldo Antônio Micali, pela colaboração sempre prestimosa para preparação do medicamento homeopático.

Aos professores do mestrado, pelos importantes ensinamentos transmitidos que me permitiram vislumbrar o mundo da ciência com mais clareza e espírito crítico.

A Prof.^a Msc. Adriana da Silva Brito pela ajuda durante a parte prática deste trabalho.

A todos da equipe do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – Biopol do Centro de Biociências na pessoa do Doutorando Rafael Barros Gomes da Camara e do Mestrando Moacir Fernandes de Queiroz Neto pela prestimosa ajuda.

A Dr^a Ana Katarina Menezes da Cruz do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências pela colaboração sempre solícita para o desenvolvimento dos experimentos.

A Prof.^a Dr^a Tatjana de Souza e Francisco Freire pela disposição na utilização do citômetro de fluxo e no esclarecimento de algumas dúvidas.

As colegas Thereza Mylene, Carolina, Maria Girlene, Fátima Freire pelo apoio e estímulo nas horas mais difíceis da execução deste trabalho.

A Nilma e pelo apoio indispensável durante o período de realização deste trabalho.

“... A Homeopatia repousa unicamente sobre a experiência. Imitai-me, mas imitai-me bem e vereis a cada passo a confirmação de minha afirmativa.”

Samuel Hahnemann

RESUMO

Os medicamentos homeopáticos têm sido utilizados por mais de duzentos anos, sem a verificação dos seus efeitos em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Devido à peculiaridade das preparações homeopáticas, sua alta diluição, que cria um desafio para a utilização das técnicas analíticas usuais do controle de qualidade de medicamentos. Embora exista escassez de literatura e heterogeneidade de experimentos, recentemente existem alguns estudos com poucos ensaios *in vitro* que têm apresentado respostas positivas quando se avalia o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos que são capazes de atuar em um sistema específico. O presente estudo visa à avaliação da eficácia dos produtos homeopáticos contendo *Momordica charantia* através de bioensaios. Os produtos homeopáticos foram avaliados pelo teste do MTT para verificação da citotoxicidade em RAW 264.7 (macrófago murino) e em células tumorais HeLa (Adenocarcinoma cervical uterino humano), CHO K1 (Células de ovário de Hamster chinês), PANC-1 (Carcinoma de pâncreas humano) e PC-3 (Adenocarcinoma de próstata humano); pela dosagem de mediadores da inflamação NO, TNF- α e IL-6 liberados por células RAW 264.7 e pela análise do processo de morte e da alteração do ciclo celular de PC-3 por citometria de fluxo. Os dados demonstraram que os produtos homeopáticos de *Momordica charantia* não apresentaram citotoxicidade para RAW 264.7, aumentaram a produção dos mediadores da inflamação por RAW 264.7 sinergicamente com LPS, mostraram citotoxicidade para PC-3 com alteração no seu ciclo celular inibindo sua proliferação, sendo 30CH a amostra mais potente. Foram realizados estudos de correlação visando avaliar os possíveis modelos *in vitro* aplicáveis ao controle de qualidade de produtos homeopáticos contendo *Momordica charantia*. Os dados demonstraram que os melhores modelos aplicáveis na avaliação da qualidade são o teste do MTT para avaliar citotoxicidade em RAW 264.7 e PC-3 em 24 horas para os produtos de *Momordica charantia* (_{fr}) e dosagem da produção de NO por RAW 264.7 com e sem LPS.

Palavras chaves: Homeopatia. *Momordica charantia*. Ensaios biológicos *in vitro*, Citotoxicidade, Citocinas, Controle de qualidade.

ABSTRACT

Homeopathic medicines have been used for over two hundred years without the examination of their effects on *in vivo* and *in vitro* assays, due to the peculiarity of homeopathic preparations, the high dilution, which creates a challenge for the use of usual analytical techniques of quality control of medicine. Although there is scarcity of literature and variety of experiments, recently there have been some studies with few *in vitro* assays which have shown positive responses when evaluating the mechanism of action of homeopathic medicines which are able to act on a specific system. The present study aims to evaluate the efficacy of homeopathic products containing *Momordica charantia* through bioassays. Homeopathic products were tested by the MTT to assess cytotoxicity in RAW 264.7 (macrophage-like cells) and in tumor cells HeLa (human cervical adenocarcinoma cells), CHO K1 (Chinese hamster ovary cells), PANC-1 (human pancreas cancer cells) and PC-3 (human prostate cancer cells), dosage of inflammatory mediators NO, TNF- α and IL-6 released by RAW 264.7 cells, analysis of the death process and cell cycle changes of PC-3 by flow cytometry. The data demonstrate that homeopathic products of *Momordica charantia* did not show cytotoxicity to RAW 264.7, increased the production of inflammatory mediators by RAW 264.7 synergistically with LPS, showed cytotoxicity to PC-3 with change in its cell cycle inhibiting its proliferation, being the 30CH the most potent sample. Correlation studies were conducted in order to evaluate the possible *in vitro* applicable models to the quality control of homeopathic products with *Momordica charantia*. The data showed that the best applicable models in assessing the quality are the MTT to assess cytotoxicity in RAW 264.7 and PC-3 in 24 hours for *Momordica charantia* fruit products and dosage of NO production by RAW 264.7 with and without LPS.

Keywords: Homeopathy, *Momordica charantia*, Biological assays *in vitro*, Cytotoxicity, Cytokines, Quality Assurance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Momordica charantia</i> folhas, flor e frutos	33
FIGURA 2	Propriedades medicinais da <i>Momordica charantia</i>	35
FIGURA 3	Redução do MTT por enzimas mitocondriais	37
FIGURA 4	Mecanismo de reação do nitrito com reagente de Griess	38
FIGURA 5	Coleta da <i>Momordica charantia</i>	43
FIGURA 6	Esquema de preparação das Tinturas mãe utilizadas na preparação dos produtos de <i>Momordica charantia</i>	47
FIGURA 7	Esquema de obtenção a partir de TM de folha e fruto de produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> ; A : na escala centesimal de Hahnemann (cada Z corresponde a uma diluição de 1/100); B : na escala decimal de Hering. (cada Z corresponde a uma diluição de 1/10)	48
FIGURA 8	Esquema de avaliação da citotoxicidade das linhagens celulares não tumorais e tumorais tratadas com produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> e tinturas mãe pelo teste de MTT	50
FIGURA 9	Esquema da quantificação de nitrito presente no meio de cultura exposto a células RAW 264.7 na presença e ausência de LPS tratadas com produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> e tinturas mãe	51
FIGURA 10	Esquema da dosagem da liberação de biomarcadores inflamatórios TNF- α e IL6 por células RAW 264.7 na presença de LPS tratadas com produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> e tinturas mãe	52
FIGURA 11	Esquema de avaliação do efeito na morte e no ciclo das células PC-3 tratadas com produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> e tinturas mãe	53
FIGURA 12	Esquema da seleção dos modelos aplicáveis ao controle de qualidade de produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i> e tinturas mãe	55

- FIGURA 13 Atividade proliferativa em linhagem celular RAW 264.7 tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e por sonicação; (A) TM (fr) e (f); (B) *M. charantia* (fr) e (f) 3DH; (C) *M. charantia* (fr) e (f) 6CH; (D) *M. charantia* (fr) e (f) 12CH; (E) *M. charantia* (fr) e (f) 18CH; (F) *M. charantia* (fr) e (f) 30CH 57
- FIGURA 14 Razão da quantidade de óxido nítrico liberado por percentual de viabilidade de células RAW 264.7 com adição de LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH;. (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f) 62
- FIGURA 15 Razão da quantidade de óxido nítrico liberado por percentual de viabilidade de células RAW 264.7 sem adição de LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f) 63
- FIGURA 16 Razão da quantidade de TNF- α liberado por número de células RAW 264.7 viáveis com LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), Produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f) 66
- FIGURA 17 Razão da quantidade de IL6 liberada por número de células RAW 264.7 viáveis com LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f) 70

- FIGURA 18 Atividade antiproliferativa das linhagens celulares HeLa, CHO K1, PANC-1 e PC-3 tratadas com TM (fr) e produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30 CH preparados a partir do extrato obtido por maceração 73
- FIGURA 19 Atividade antiproliferativa das linhagens celulares HeLa, CHO K1, PANC-1 e PC-3 tratadas com TM (f) e produtos homeopáticos de *M. charantia* (f) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30CH preparados a partir do extrato obtido por maceração 74
- FIGURA 20 Análise de citometria de fluxo de células PC-3 tratadas por 24 horas com produtos preparados de extrato obtido por maceração; (A) Gráfico de pontos do controle, TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Gráfico de pontos do controle, TM (f), *M. charantia* (f) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Gráfico de barras representa a média \pm desvio padrão (n=2) 78
- FIGURA 21 Análise de citometria de fluxo de células PC-3 tratadas por 48 horas com produtos preparados a partir do extrato obtido por maceração; (A) Gráfico de pontos do controle, TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Gráfico de pontos do controle, TM (f), *M. charantia* (f) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Gráfico de barras representa a média \pm desvio padrão (n=2) 80
- FIGURA 22 Análise de ciclo celular de células PC-3 tratadas por 24 horas com produtos preparados a partir do extrato obtido por maceração; (A) Representação de *Dot plots* após análise no FlowJo de PC-3 tratada com TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Representação de *Dot plots* após análise no FlowJo de PC-3 tratada com TM (f), *M. charantia* (f) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Tabela sumarizada das médias dos valores obtidos em duas determinações \pm desvio padrão (n=2) 82

- FIGURA 23 Curva de regressão linear de TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e dos produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH, 30CH; (A) Percentual de inibição da proliferação de Células RAW 264.7 após 24 h pela diluição; (B) Percentual de inibição da proliferação de Células RAW 264.7 após 24 h pela dinamização 86
- FIGURA 24 Curva de regressão linear de TM (fr) preparada a partir do extrato obtido por maceração e dos produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH, 30CH; (A) Percentual de inibição da proliferação de Células PC-3 após 24 h pela diluição; (B) Percentual de inibição da proliferação de Células PC-3 após 24 h pela dinamização 86
- FIGURA 25 Curva de regressão linear razão da liberação de NO por Células RAW 264.7 com LPS tratadas após 24 h. Pela diluição (A) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH. Pela dinamização (C) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (D) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH 88
- FIGURA 26 Curva de regressão linear razão da liberação de NO por Células RAW 264.7 sem LPS tratadas após 24 h. Pela diluição (A) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH. Pela dinamização (C) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (D) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH 90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Medicamentos homeopáticos e ensaios <i>in vitro</i>	31
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABFH	Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHP	Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CH	Centesimal Hahnemanniana
CBA/H	Camundongo geneticamente modificado do tipo Agouti, H-2 ^k
C57BL/6	Camundongo geneticamente modificado usado como modelo para estudo de doenças humanas
CHO K1	Células de ovário de Hamster chinês
CK	Centesimal Korsakovina
COX 1	Ciclo-oxigenase1
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
<i>d</i>	Dinamizado
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DH	Decimal de Hering
DLA	Dalton's Lymphoma Ascites
DLD-1	Célula de câncer de cólon humano
DU154	Carcinoma de próstata humano
EAC	Erlich Ascites Carcinoma
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETOH	Etanol
<i>f</i>	Folha
FHB	Farmacopéia Homeopática Brasileira
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>fr</i>	Fruto
FSC	Forward angle light scatter
G0	Período de repouso
G1	Período de produção de proteína

G2	Período pré-mitótico
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
HeLa	Adenocarcinoma cervical uterino humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HL-60	Célula da leucemia promielocítica humana
HT-29	Célula do carcinoma de cólon humano
IC50	Concentração máxima média inibitória
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina -6
IL-8	Interleucina -8
IL-10	Interleucina -10
IL1 β	Interleucina-1beta
INF- γ	Interferon gama
J774.G8	Macrófago murino
LN CaP	Carcinoma de próstata humano
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
L929 cells	Fibroblastos de ratos
5-LOX	5-lipoxigenase
KB-V1	Carcinoma cervical humano
KB-3-1	Carcinoma cervical humano droga sensível
KuJ	Kuguacin J
M	Mitose
MAT-LyLu	Câncer de próstata de rato
MCP30	Momordica proteína de 30 kDa
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano
mM	miliMolar
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenil tetrazolium bromide
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
NO	Óxido nítrico
PANC-1	Carcinoma de pâncreas humano
PBS-EDTA	Tampão fosfato-salino- Etilenodiaminotetracético
PC-3	Adenocarcinoma de próstata humano

PHA	Fitoheмоaglutinina
PI	Iodeto de propídio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
P/V	Peso por volume
RAW 264.7	Macrófago murino
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI 1640	Meio composto de mistura de sais enriquecido com aminoácidos e vitaminas
RT-PCR	Método de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
S	Síntese de DNA
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Side angle light scatter
SUS	Sistema Único de Saúde
TM	Tinturas mãe
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
7TD	Hibridoma de murinho
US	Ultrassom
V/V	Volume por volume
WST-1	Teste colorimétrico da Roche Diagnóstico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	HOMEOPATIA	21
2.2	MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO	23
2.3	FARMACOTÉCNICA HOMEOPÁTICA VS CONTROLE DE QUALIDADE	24
2.4	PROBLEMAS DA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS	26
2.4.1	Qual método escolher?	26
2.4.2	Ensaio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> utilizados na avaliação de medicamentos homeopáticos	27
2.5	<i>MOMORDICA CHARANTIA</i>	32
2.5.1	Fitoquímica da <i>Momordica charantia</i>	33
2.5.2	Atividades farmacológicas da <i>Momordica charantia</i>	34
2.5.3	Produtos homeopáticos de <i>Momordica charantia</i>	36
2.6	MODELOS <i>IN VITRO</i> UTILIZADOS PARA TESTAR A QUALIDADE DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE <i>Momordica charantia</i>	36
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	43
4.2	LINHAGENS E CULTURAS CELULARES	44
4.3	OUTROS MATERIAIS	44
4.4	APARELHOS	45
4.5	MÉTODOS	46
4.5.1	Preparação das tinturas mãe	46
4.5.2	Preparação dos produtos homeopáticos	47
4.5.3	Teste de MTT	49
4.5.4	Quantificação de nitrito presente no meio de cultura exposto a células RAW 264.7	50

4.5.5	Dosagem de biomarcadores inflamatórios TNF-α e IL6	51
4.5.6	Análises por citometria de fluxo	52
4.5.6.1	Avaliação da morte celular por Anexina V-FITC/ iodeto de propídio (PI)	52
4.5.6.2	Ciclo celular	54
4.5.7	Seleção dos modelos aplicáveis ao controle de qualidade de produtos homeopáticos	54
4.5.8	Análise estatística	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM RAW 264.7 PELO ENSAIO COM MTT	56
5.2	DOSAGEM DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS RAW 264.7	61
5.3	DOSAGEM DE BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO TNF- α POR CÉLULAS RAW 264.7 COM LPS	65
5.4	DOSAGEM DE BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO IL6 POR CÉLULAS RAW 264.7 COM LPS	69
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE A CÉLULAS TUMORAIS PELO ENSAIO COM MTT	72
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE <i>Momordica charantia</i> (fr) E (f) E SUAS RESPECTIVAS TM NA MORTE DAS CÉLULAS PC-3	77
5.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE <i>Momordica charantia</i> (fr) E (f) E SUAS RESPECTIVAS TM NO CICLO DAS CÉLULAS PC-3	81
5.8	MODELOS APLICÁVEIS AO CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS HOMEOPÁTICOS	85
6	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Hahnemann publicou em 1805 a primeira matéria médica homeopática com 27 substâncias testadas e em 1810, a primeira edição de seu livro básico *Organon da arte de curar*, onde se encontram a doutrina homeopática e seus ensinamentos. Nas várias edições no total de seis, apresentam-se técnicas de preparação do medicamento homeopático, mas não há métodos voltados para o controle da qualidade destes produtos homeopáticos.

Até o momento, as ferramentas para avaliação da qualidade são superficiais ou inadequadas à aplicação nas preparações homeopáticas, pois estas apresentam uma peculiaridade que é a sua alta diluição, característica que cria um desafio para a utilização das técnicas analíticas baseadas na avaliação químico/quantitativa, usuais do controle de qualidade de medicamentos.

A determinação dos critérios qualitativos baseados na avaliação físico-química é aplicável somente às Tinturas-Mãe e possivelmente às dinamizações até 3CH ou 6DH; o que constitui um número ínfimo de preparações comparadas àquelas de estoque em potência mais elevada.

O desenvolvimento de um programa de controle *in vitro* de qualidade padronizado faz-se necessário, diante das dificuldades na utilização das técnicas analíticas físico-químicas, que são usuais ao controle de qualidade de medicamento alopáticos.

Portanto tem-se como desafio a descoberta de ferramentas para avaliação dos produtos homeopáticos com potências mais elevadas, ou seja, produtos altamente diluídos e dinamizados e que possam ser aplicadas no controle de qualidade dos medicamentos homeopáticos.

O presente estudo visa avaliar possíveis efeitos dos produtos homeopáticos com baixas e altas diluições/dinamizações contendo *Momordica charantia* através de ensaios *in vitro*, contribuindo com a produção de medicamentos homeopáticos, bem como, com o seu controle de qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HOMEOPATIA

A homeopatia é uma terapêutica criada pelo médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann no ano de 1796, baseada na estimulação da capacidade reacional do indivíduo. Segundo Hahnemann no §2 da 6ª edição do *Organon*:

O caminho mais alto de cura é rápida, suave e permanente restabelecimento da saúde, ou remoção e aniquilamento da doença em toda sua extensão no mais curto, mais confiável e mais inofensivo, em princípios facilmente compreensíveis (HAHNEMANN, 1994, p.21).

A descoberta de Hahnemann foi fundamentada numa forma de tratamento já preconizada por Hipócrates, o semelhante é curado pelo semelhante (*Similia Similibus Curentur*). Partindo dessa observação de natureza empírica, ele desenvolveu um protocolo de experimentos particulares, cujos resultados experimentais resultaram na sistematização científica deste princípio hipocrático: a filosofia, a farmacologia, a clínica e a farmacotécnica homeopática estavam, a partir daí, prontas ao serviço da humanidade (TEIXEIRA, 2006).

Um tratamento homeopático é exclusivamente medicamentoso, consistindo em ministrar ao paciente medicamento diluído e dinamizado, visando estimular a reação orgânica e evitar a agravação dos sintomas. Baseia-se em quatro princípios experimentais: o *Princípio da Experimentação no Homem São*, ou *Princípio da Experimentação Pura*, segundo o qual o efeito farmacológico de um medicamento só pode ser conhecido se previamente experimentado no ser humano sadio; o *Princípio da Similitude*, de acordo com o qual qualquer doença reversível pode ser tratada por um medicamento cuja patogenesia do medicamento, determinada pelo Princípio da Experimentação Pura, seja semelhante aos sinais e sintomas dessa doença; o *Princípio das Doses Mínimas* segundo o qual um medicamento para atuar homeopaticamente deve ser previamente dinamizado, ou seja, passar por processos sucessivos de diluição e sucussão ou trituração; e o *Princípio do Medicamento*

Único, de acordo com o qual se deve utilizar um único medicamento por vez para tratar um enfermo (TEIXEIRA, 2006).

Hahnemann descobriu e desenvolveu as regras básicas da medicina e da farmácia homeopática. Ele definiu os métodos para obter as potências homeopáticas e a partir desses medicamentos, começou a descrição dos seus sintomas que estão contidos nos livros *Matéria Médica Pura e Doenças Crônicas* presentes na literatura de matéria médica homeopática e repertórios até hoje (DELLMOUR, 1998).

A homeopatia chegou ao Brasil em 1840 pelo médico francês Dr. Benoit Jules Mure. Naquela época, o Brasil não possuía autonomia para a produção dos medicamentos, sendo as matérias-primas homeopáticas (tinturas, minerais, vegetais) importadas, principalmente da Europa (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

Expandiu-se até a década de 1930, entrando num longo período de declínio até ser considerada quase extinta no final dos anos 60. A mudança de paradigmas surgidos a partir dessa década suscitou a busca por uma medicina menos agressiva resultando, em particular, no ressurgimento da Homeopatia; o crescimento experimentado nas duas décadas que se seguiram elevou a Homeopatia ao *status* de prática médica oficializada no Brasil em 1980 (RESOLUÇÃO 1000/80 CFM) e sua introdução no Sistema Público de Saúde a partir de 1985. Foi a partir dessa década que se observa uma multiplicação geométrica de Farmácias Homeopáticas em todo país, alcançando seu ápice em meados da década de 90 (LUZ, 1997).

Em 2006 o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), com o intuito de incentivar e apoiar projetos de assistência, ensino e pesquisas homeopáticas nas diversas esferas do SUS, juntamente com outras práticas não convencionais (TEIXEIRA, 2006).

A homeopatia encontra-se difundida em vários países pelo mundo e a ciência homeopática continua em franco desenvolvimento, com trabalhos científicos sendo realizados com diferentes modelos, tais como: animais de laboratório, culturas de células, modelos físico-químicos, dentre outros. Os ensaios clínicos, duplo-cego, randomizados, placebo controlados continuam sendo feitos, na busca da consolidação científica da homeopatia. Cientistas de todo o mundo vem desenvolvendo protocolos visando à compreensão dos efeitos das substâncias diluídas e dinamizadas utilizadas por esta terapêutica que valoriza não apenas a

doença, mas, também o doente, com as suas suscetibilidades, fragilidades, heranças genéticas e inconstâncias emocionais (TEIXEIRA, 2006).

2.2 MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO

Compreende-se como medicamento homeopático toda preparação farmacêutica obtida pelo método de dinamização, que consiste na diluição e sucussão ou trituração sucessiva de um insumo ativo juntamente com um insumo inerte, e utilizada clinicamente segundo o *Princípio da Similitude*. No Brasil, o preparo dos medicamentos homeopáticos é respaldado pela Farmacopeia Homeopática Brasileira que teve sua primeira edição publicada em 1977 e mais recentemente foi publicada sua terceira edição (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

Para se tornar um medicamento homeopático, a substância deve ser experimentada em indivíduos humanos, segundo um protocolo de experimentação patogênica, e ter seus efeitos primários (mentais, gerais e físicos) descritos em livros textos (matérias médicas homeopáticas) (TEIXEIRA, 2006).

Além desse princípio, a Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011) ainda leva em consideração que um medicamento homeopático deve se apresentar em formas farmacêuticas de dispensação para uso interno ou externo como as líquidas (gotas e dose única líquida) e as sólidas (comprimidos, glóbulos, pós, tabletes e dose única sólida). Outro produto que também pode ser considerado medicamento homeopático é o bioterápico. Contudo, há algumas ressalvas que devem ser levadas em consideração: tecnicamente apenas os bioterápicos de estoque (Codex) que têm patogenias definidas seriam considerados medicamentos homeopáticos por definição. No entanto, estas definições ainda confundem o leitor, pois a Farmacopeia Homeopática Brasileira diz que os demais bioterápicos devem ser enquadrados na categoria de “Homeopáticos”, uma vez que também são preparações dinamizadas (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

O medicamento homeopático age no sistema de auto regulação, que é responsável por dispor os órgãos de modo a equilibrar as variações constantes

internas. É classificado em sistêmico, aquele que atua em vários sistemas de auto regulação; circunstancial que atua no nível de priorização sistêmica na instabilidade aguda; e equalizador que tem afinidade pelo sistema de auto regulação de um órgão no limite de suas funções durante a fase crônica da instabilidade (CARILLO, 2008).

2.3 FARMACOTÉCNICA HOMEOPÁTICA VS CONTROLE DE QUALIDADE

A padronização e o controle de qualidade dos medicamentos homeopáticos devem estar de acordo com a matéria médica original, bem como as monografias da farmacopéia. Os sintomas característicos de cada medicamento vêm principalmente das propriedades físicas, químicas, biológicas e patológicas das substâncias utilizadas no seu preparo. A eficácia homeopática é influenciada pelo método da potencialização e da apresentação, que modificam as propriedades dinâmicas (rapidez, duração e profundidade da ação homeopática) do medicamento final (DELLMOUR, 1998).

Em relação às preparações homeopáticas no Brasil, até 1977 eram feitas de acordo com farmacopéias e códigos de outros países. Nesse mesmo ano, foi publicada a primeira edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira. Devido ao crescimento da Homeopatia, os próprios farmacêuticos homeopatas, mobilizados através da ABFH, demonstraram a preocupação com o desenvolvimento de um programa de normatização de práticas nas farmácias homeopáticas do país, uma vez que a Farmacopéia Homeopática Brasileira em vigor não se adequava à realidade do momento. Em 1992, a Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas (ABFH) lançou a primeira edição do Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática, que tinha como um dos objetivos principais “apresentar aos profissionais um conjunto de informações a respeito dos procedimentos gerais envolvendo a origem, preparação, conservação, dispensação e outras características dos medicamentos homeopáticos”. A partir de então, cada vez mais se estimulou a padronização no preparo dos insumos e medicamentos homeopáticos e serviu de base para a segunda edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira de 1997 (DIELH et al, 2008). Atualmente a versão mais atual da Farmacopeia Homeopática Brasileira (FHB) data de 2011 3. ed..

Paralelamente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 33, substituída atualmente pela RDC nº 67, estabelecia os critérios para as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias, critérios esses igualmente aplicáveis à manipulação de medicamentos homeopáticos. Ela estabelece que a manipulação de medicamentos homeopáticos deva seguir o Regulamento Técnico, o Anexo V (específico para as farmácias homeopáticas) e, quando aplicável, o Anexo I (BRASIL. ANVISA, 2007). O que se observa disso é que atualmente, respeitando as suas peculiaridades, a exigência sobre a qualidade dos medicamentos homeopáticos é a mesma que para os medicamentos ditos alopáticos dentro das normas sanitárias de nosso país.

Uma peculiaridade das preparações homeopáticas é a sua alta diluição. Essa característica cria um desafio para a utilização das técnicas analíticas usuais do controle de qualidade de medicamento. Por essa razão a RDC nº67 atribui um *status* especial aos medicamentos homeopáticos, considerando que essas dificuldades não podem ser resolvidas em curto prazo. A respeito do controle de qualidade, entendendo-se aqui como Controle de Qualidade de Preparações Magistrais e Oficiais e o Monitoramento do Processo Magistral, a RDC nº67 estabelece no item 9.3 do Anexo I que: “Ficam excluídos dos controles de que trata o item 9 os Medicamentos Homeopáticos” (BRASIL. ANVISA, 2007, p.20).

Isso é posto porque as regras específicas são aquelas estabelecidas no Anexo V, onde o controle deve ser feito respeitando as peculiaridades dos medicamentos homeopáticos, isto é, as referentes ao seu caráter diluído. Como regra se o insumo ativo tem alguma metodologia descrita, ele deve ser adquirido com certificado de análise e no caso contrário, deve ser adquirido com a descrição de seu preparo. Já quando se trata de preparações diluídas, como as Matrizes de estoque, cujas diluições são em grande parte menores que 10^{-6} , a RDC exige que esse controle seja feito baseando-se apenas em análises microbiológicas.

Neste ponto já se torna evidente a dificuldade imposta pelas características dessa categoria de medicamentos. O problema, porém, torna-se ainda mais desafiador quando se trata da determinação de prazos de validade. No item 15.4 do Anexo I do referido documento, diz-se sobre a determinação de prazo de preparações magistrais:

A determinação do prazo de validade deve ser baseada na avaliação físico-química das drogas e considerações sobre sua estabilidade. Preferencialmente o prazo de validade deve ser vinculado ao período do tratamento (BRASIL. ANVISA, 2007, p.23).

O critério principal para determinação do prazo de validade, a avaliação físico-química, é aplicável somente às Tinturas-Mãe e às dinamizações até 3CH ou 6DH; acima dessas potências a maioria dos métodos de quantificação usuais no controle de qualidade de medicamentos não tem aplicação. Contudo, na prática o controle de qualidade só é realizado com a TM. Deve-se levar em conta ainda que as TM e matrizes em baixa potência constituem um número ínfimo de preparações comparadas àquelas de estoque em potência mais elevada.

A Farmacopeia Homeopática Brasileira terceira edição de 2011 recomenda as determinações químicas, físicas e físico-químicas, métodos de análise de drogas vegetais e métodos microbiológicos descritos na Farmacopéia Brasileira quinta edição, no que se refere ao controle de qualidade da TM.

Em suma, não há nenhum método proposto para atestar a qualidade de um produto final homeopático, ou seja, medicamento homeopático dispensado para uso do paciente.

2.4 PROBLEMAS DA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS

2.4.1 Qual método escolher?

Ao longo de duzentos anos de homeopatia, milhares de substâncias foram experimentadas conforme o Organon, § 105:

Para se adquirir o conhecimento dos instrumentos destinados à cura das doenças naturais, averiguando-se o poder patogenético dos medicamentos, a fim de que, quando precisar curar, possa escolher, entre eles, um cujas manifestações sintomáticas possam constituir uma doença artificial tão semelhante quanto possível à totalidade dos sintomas principais da doença natural a ser curada (HAHNEMANN, 1994, p.100).

Somente nas décadas recentes alguns grupos de pesquisadores iniciaram com medicamentos homeopáticos disponíveis comercialmente, especialmente formulações complexas de baixas doses a verificação dos seus efeitos em ensaios *in vivo* e *in vitro* (BELLAVITE; ORTOLANI; CONFORTI, 2006).

Para Bellavite et al. (2006) o uso de medicamentos ultradiluídos pela homeopatia deve ser considerado como um novo paradigma de transmissão de informação biológica em sistemas complexos.

Os problemas levantados pela homeopatia são muito amplos e complexos por isso não existe um simples experimento que possa esclarecer todas as teorias homeopáticas: efeito das altas diluições - como uma substância diluída e dinamizada com pouca ou nenhuma molécula de princípio ativo pode ter efeito farmacológico; o mecanismo de ação do efeito "similia" – como uma substância conhecida por ter um efeito patogênico na saúde do organismo (células, animais e humanos) pode tornar-se agente terapêutico em organismos doentes (BELLAVITE et al., 2006).

2.4.2 Ensaios *in vivo* e *in vitro* utilizados na avaliação de medicamentos homeopáticos

O potencial de cura do medicamento homeopático é amplamente aceito, embora o seu exato mecanismo de ação, seja por ação primária nos tecidos ou através de modificação imunológica, ainda não esteja totalmente esclarecido (BELLAVITE et al., 2006).

Os modelos animais são utilizados pela homeopatia tanto para testar o princípio da diluição/dinamização, como para estudar o possível mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos. O objetivo deste tipo de trabalho experimental é o de proporcionar uma abordagem racional para a investigação dos vários aspectos do princípio da *similia similibus curentur* e da utilização de elevadas diluições, a fim de construir um quadro plausível de ideias capazes de facilitar a pesquisa básica e clínica deste princípio médico histórico e também moderno. Compreende a pesquisa pré-clínica para testar em animais os medicamentos antes de sua utilização em seres humanos, a pesquisa veterinária para encontrar novas terapias de baixa

toxicidade para animais e a determinação em ambientes controlados e reprodutíveis de aspectos específicos e mecanismos de ação da abordagem homeopática. Todas muito importantes e urgentes, mas nenhuma delas pode responder à questão de saber se a homeopatia traz uma cura eficaz para os seres humanos (BELLAVITE et al., 2006).

Dentre os ensaios *in vivo* utilizados na avaliação da eficácia dos medicamentos homeopáticos pode-se destacar a avaliação comportamental, inflamatória, antitóxica, carcinogênica, hipoglicemiante, de coagulação, de crescimento e diferenciação celular e de interação parasita-hospedeiro, tendo como modelo rato, camundongo, porco, vaca, sapo, galinha e outros (BONAMIN; ENDLER, 2010).

Para Bellavite et al. (2006) os estudos *in vitro* permitem ajudar a caracterizar os princípios ativos, que estão, sem dúvida, presentes no extrato bruto (TM) e em baixas diluições. Eles possibilitam uma melhor definição dos problemas únicos, isto é, os sintomas relacionados com um sistema complexo (órgão, célula) afetado. Embora perca a capacidade de se avaliar uma abordagem terapêutica em toda a sua integridade, deve ser tomado para permitir o avanço científico e não como uma prova ou um revelar-se errado da homeopatia em si, porque de acordo com a homeopatia clássica o fenômeno por si só é visto como uma expressão da dinâmica de cura natural, isto é o medicamento homeopático atua regulando o processo patológico. Sua importância reside no fato de que eles tem tornado possível a obtenção da evidência de alguns efeitos preliminares das altas diluições/dinamizações sob condições que excluam qualquer possível efeito da sugestão (BELLAVITE et al., 2006).

Os experimentos com células especialmente os leucócitos representam um campo fértil no qual os pesquisadores homeopáticos e convencionais têm trabalhado em conjunto. Os métodos bem estabelecidos usados na imunologia moderna e na biologia celular foram adaptados para testar os efeitos *in vitro* dos fármacos homeopáticos disponíveis comercialmente ou dos princípios ativos ultradiluídos, de acordo com a metodologia tradicional homeopática. Além disso, o princípio da similitude foi também explorado em modelos reducionistas baseados em diferentes respostas de células inflamatórias em várias condições experimentais relatado por Bellavite et al.(2006).

Um exemplo claro da aplicação do que foi dito acima pode ser evidenciado com o estudo da ativação de basófilos. A ativação biológica destas células e o teste de degranulação de basófilo foram realizados com *Apis mellifica* 9CH e 15CH por Poitevin et al. (1985) e Poitevin et al. (1986) e em estudo multicêntrico usando altas diluições de Histamina, sendo capaz de confirmar sua ação na ativação de basófilo determinada por citometria de fluxo conforme descrevem Brown e Ennis. (2001).

Em outros trabalhos o que se tem observado é utilização de marcadores radioativos (H^3 -timidina) para se verificar o efeito do medicamento homeopático na proliferação de linfócitos. Como descrito para a *Phytolacca* (COLAS et al., 1975), que mostrou que na 15CH este medicamento apresentava maior atividade mitogênica. Já Bildet et al. (1981) relataram que o maior efeito foi alcançado na 7CH.

Medicamentos homeopáticos compostos foram também testados *in vitro* como *Engystol – N* nas diluições de 10^{-4} e 10^{-8} por Fimiani et al. (2000). Neste trabalho culturas de linfócitos T foram estimuladas pelo medicamento sugerindo sua atividade imunomodulatória.

A *Canova*, outro medicamento composto, mostrou que seu mecanismo de ação passa pelo estímulo do sistema imune através da ativação dos macrófagos, (SATO et al., 2005). Foi observado que este medicamento não possui propriedade genotóxica para linfócitos, de acordo com Seligmann et al. (2003). *Traumeel S*, uma formulação homeopática composta, testada por Porozov et al. (2004) em células T humanas, do epitélio intestinal e monócitos foi capaz de inibir nestas células a secreção de Interleucina-1beta (IL-1 β), Fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e Interleucina-8 (IL-8) nas diluições de 10^{-3} para 10^{-6} . *Zeel N*, complexo anti-inflamatório homeopático, teve seu mecanismo de ação elucidado com teste de inibição da síntese de leucotrieno B4 e prostaglandina pela 5-lipoxigenase (5-LOX) e ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e 2) por Jaggi et al. (2004) mostrando efeito inibitório distinto sobre as enzimas 5-LOX e COX-1 e COX-2.

Dentre os testes para verificação dos efeitos das diluições homeopáticas sobre os leucócitos tem-se o de produção de radicais livres de oxigênio por granulócitos estimulados por zimosan na presença de *Belladonna* e *Ferum phosphoricum* em 5CH e 9CH. Os dados mostraram que estes medicamentos apresentam inibição com sensibilidade individual (POITEVIN et al., 1983). Há outros trabalhos com diferentes tipos de leucócitos que mostram que os efeitos dos medicamentos homeopáticos são amplamente influenciados pela variabilidade

genética das células avaliadas (FLETCHER; HALPERN 1988; CHIRUMBOLO et al., 1993; CHIRUMBOLO et al., 1997).

Vale à pena salientar que é possível encontrar dados contraditórios sobre o efeito de um medicamento homeopático. Como por exemplo, complexo homeopático *Traumeel S* apresentou efeito estimulante de neutrófilos (CONFORTI et al., 1997). Porém em um trabalho posterior este efeito não foi observado (LUSSIGNOLI et al., 1999).

Os principais testes para se avaliar a citotoxicidade de um medicamento homeopático podem ser identificados no trabalho publicado por Sunila et al. (2009), e são eles: teste de exclusão pelo azul de tripan, teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium), teste de formação de colônia com células CHO (células de ovário de Hamster chinês), teste de incorporação de H³-timidina, verificação de indução de apoptose por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) para os genes P53, Bcl-2 e caspase-3.

A tabela 1 nos permite uma melhor visualização dos medicamentos homeopáticos e os testes *in vitro* para eles utilizados.

TABELA 1 – Medicamentos homeopáticos e ensaios *in vitro*

Ensaio <i>in vitro</i>	Medicamentos homeopáticos / princípios ativos ultradiluídos	Referência
Ativação biológica de basófilos e Teste de degranulação de basófilo.	<i>Apis mellifica</i> 9CH e 15CH	Poitevin et al. 1985 e 1986
Ativação de basófilo determinada por citometria de fluxo.	Altas diluições de Histamina	Brown e Ennis, 2001
Teste de proliferação de linfócitos medida por incorporação de H ³ -timidina	<i>Phytolacca</i> 15CH	Colas et al.1975
Teste de proliferação de linfócitos medida por incorporação de H ³ -timidina	<i>Phytolacca</i> 7CH	Bildet et al.1981
Teste da ativação de linfócitos humanos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e imunodeprimidos	<i>Apis mel</i> e <i>Phosphorus</i> nas diluições 10 ⁻⁷ , 10 ⁻¹⁵ e 10 ⁻³⁰	Chirila et al.1992
Teste de estimulação de citocina pela geração de ânion superóxido em cultura de Linfócitos T	<i>Engystol – N</i> nas diluições de 10 ⁻⁴ e 10 ⁻⁸	Fimiani et al. 2000
Teste de ativação dos macrófagos	<i>Canova</i>	Sato et al. 2005
Teste de genotoxicidade para linfócitos	<i>Canova</i>	Seligmann et al. 2003
Teste de secreção IL1 β , IL8 e TNF- α com cultura de células T humanas, epiteliais de intestino e monócitos.	<i>Traumeel S</i> nas diluições de 10 ⁻³ para 10 ⁻⁶	Porozov et al. 2004
Teste de inibição da síntese de leucotrieno B4 e prostaglandina pela 5-LOX COX-1 e 2	<i>Zeel N</i>	Jaggi et al. 2004
Teste de produção de radicais livres de oxigênio por granulócitos estimulada por zimosan opsonizado	<i>Belladonna</i> 5CH e 9CH <i>Ferum phosphoricum</i> 5CH e 9CH	Poitevin et al.1983
Teste de quimiotaxia dos leucócitos	<i>Belladonna</i> <i>Hepar sulphur</i> <i>Pyrogenium</i> <i>Silicea</i> <i>Saphylococcinum</i>	Moss et al.1982
Teste para avaliar ação sobre o metabolismo oxidativo de granulócitos	<i>Bryonia</i> 4CH e 9CH	Fletcher e Halpern 1999
	<i>Podophyllum peltatum</i> 4DH <i>Manganum phosphoricum</i> 6DH e 8DH <i>Sulphur</i> 6DH, <i>Acidum citricum</i> 3DH, <i>Acidum succinicum</i> 3DH e 4DH, <i>Phosphorus</i> 30DH e 200DH, <i>Acidum fumaricum</i> 4DH <i>Acidum malicum</i> 4DH	Chirumbolo et al.1993 e 1997
	<i>Traumeel S</i>	Lussignoli et al.1999 Conforti et al.1997
Testes de citotoxicidade	Cloridrato de mercúrio	Boiron et al 1981 van Mansvelt e Amons 1975
	Fluoreto de cálcio Monofosfato de cálcio	Palemo et al. 1999 Manduca et al.2005
Teste de exclusão pelo Tripan Blue com células DCA e EAC Teste de MTT com células L929 Teste de formação de colônia com células CHO Teste de incorporação de H ³ timidina com células L929 Teste de expressão do Gen pró-apoptótico. p53, do Gen anti-apoptótico Bcl-2 e Caspase3 por RT-PCR	<i>Thuya occidentalis</i> TM, 30C, 200C <i>Hydrastis canadensis</i> TM, 30C, 200C <i>Lycopodium clavatum</i> TM, 30C, 200C <i>Conium maculatum</i> TM, 30C <i>Ruta graveolens</i> TM, 30C, 200C, <i>Podophyllum peltatum</i> TM, 30C, 200C <i>Phytolacca americana</i> TM, 30C, 200C <i>Chelidonium majus</i> TM, 30C e 200C <i>Marsdenia condurango</i> TM, 30C, 200C <i>Carsinosinum</i> 30C e 200C.	Sunila et al. 2009

Engystol-N (*Vincetoxicum* e *Sulphur*),

Canova (*Thuya occidentalis*+ *Bryonia alba* + *Aconitum napellus* + *Arsenicum album* e *Lachesis mutans*),

Traumeel S (*Arnica montana* + *Calendula officinalis* + *Hamamelis virginiana* + *Achillea millefolium* + *Atropa belladonna* + *Aconitum napellum* + *Hepar sulphur* + *Symphytum officinalis* + *Mercurius solubilis* + *Bellis perennis* + *Chamomilla* + *Echinacea angustifolia* + *Purpurea* + *Hypericum*), *Zeel N* (*Anica montana* + *Rhus toxicodendron* + *Sanguinaria canadensis*).

Fonte: Adaptada de BELLAVITE et al., 2006 e SUNILA et al., 2009.

Apesar de se ter vários modelos experimentais, como visto acima, de avaliação da ação e da eficácia de medicamentos homeopáticos, os dados obtidos até o momento ainda são escassos, de qualidade preliminar e em muitas vezes não permitem replicação fácil. Por outro lado, não se podem aplicar métodos quantitativos de avaliação que têm sido desenvolvidos pela epidemiologia moderna para fármacos convencionais, o que dificulta sua aceitação pela academia (BELLAVITE et al., 2006). Porém, muitos são os dados *in vivo* e *in vitro* que mostram que medicamentos homeopáticos são efetivos.

2.5 MOMORDICA CHARANTIA

A *Momordica charantia* L., no Brasil conhecida como Melão-de-são-caetano, pertence à família Curcubitacea. Como pode ser visto na FIGURA 1 é uma trepadeira semilenhosa anual, de ramos herbáceos muito longos, comumente encontrada cobrindo cercas. Seu fruto, uma cápsula carnosa, se abre em três quando madura, deixando ver as sementes cobertas por uma massa vermelha adocicada. Suas folhas são muito amargas (MATOS, 2002).

Originalmente conhecida por seu uso na culinária e na medicina, sendo uma espécie ruderal, monóica e com flores unissexuais. Normalmente, para frutificarem necessitam da atuação de insetos para o sucesso da polinização, em especial de abelhas (LENZI et al., 2005).

Vulgarmente conhecida como pera balsâmica ou Kerela, cresce em áreas tropicais, incluindo partes da Amazônia, Leste da África, Ásia e Caribe e é cultivada em toda a América do Sul como alimento e medicamento (GUPTA et al., 2010).



FIGURA 1 - *Momordica charantia* folhas, flor e frutos.
Fonte: autor.

2.5.1 Fitoquímica da *Momordica charantia*

Os ramos e folhas apresentam como constituintes químicos mormodicina I, II e III e saponina do ácido oleanólico; nos frutos e sementes esteróide e carotenóides. Porém o componente mais importante das sementes é a proteína alfa-tricosantina (MATOS, 2002).

M. charantia ainda contém outras substâncias químicas biologicamente ativas como: glicosídeos, alcalóides, óleos fixadores, triterpenos e proteínas (RAMAN e LAU 1996).

Segundo Grover e Yadav (2004) há ainda um componente químico hipoglicemiante da *Momordica charantia* que é a mistura de saponinas esteroidais, conhecida como charantinas, peptídeos semelhantes à insulina, sendo mais concentradas no fruto. Estes apresentam pronunciada atividade hipoglicemiante/antihiperglicemiante. Já Ray et al. (2010) relatam que além da charantina (glicosídeo esteroidal), *M. charantia* sintetiza o polipeptídeo "p" ou insulina vegetal (166 resíduo de peptídeo mimético da insulina) que também possui atividade hipoglicemiante. Suas preparações demonstraram efeitos benéficos não só no metabolismo da glicose, mas também sobre os lípidos plasmáticos e hepáticos. Além disso, foi observada ação do extrato bruto de *M. charantia* sobre células

cancerosas de mama humano. Este promoveu inibição de ciclina B1 e D1 que modulam o ciclo celular, levando ao acúmulo na fase G2 / M induzindo a parada do ciclo celular e a apoptose das células tumorais. Há relatos de que o fruto verde apresenta vitamina C, vitamina A, fósforo e ferro.

Também é documentada a presença de proteínas inibitórias do HIV como MRK29, MPA30, inibidores de tripsina, elastase, de guanilato ciclase e de alfa glicosidase como D(+) trealose (PUTNAM; TAINER, 2000; JIRATCHARIYAKUL et al., 2001; WANG; NG, 2001).

No tocante a toxicidade da *M. charantia*, de suas sementes foram isoladas glicoproteínas (alfa e beta-momorcharina) que apresentam ação inibitória sobre a multiplicação celular do endométrio e miométrio de camundongo fêmea e assim possuem ação abortiva (MENGUE et al., 2001). Estudos clínicos *in vivo* têm demonstrado existir uma relativa baixa toxicidade de todas as partes do melão-de-são-caetano quando ingeridos oralmente (LAGARTO et al., 2008).

Do extrato metanólico do fruto também foi isolado o composto Momordicantina com elevada ação leishmanicida sobre *Leishmania donovani*, *in vivo* e *in vitro* (GUPTA et al., 2010).

Nerurkar e Ray (2010) citam que foi isolada uma proteína de inativação de ribossomas do extrato de *M. charantia*, momordica proteína de 30 kDa (MCP30) responsável pela ação antitumoral para câncer de mama humano e para células de câncer de próstata humano, em ambas levando a redução da expressão de importantes proteínas reguladoras do ciclo celular, como ciclina B1 e de ciclina D1, modulando a regulação do ciclo celular. Já o óleo de semente contém mais de 50-60% de ácido alfa-esteárico que suprime o crescimento de célula de câncer de cólon humano (DLD-1), induzindo a apoptose através da peroxidação lipídica levando a apoptose das células da leucemia promielocítica humana (HL60).

2.5.2 Atividades farmacológicas da *Momordica charantia*

Dentre as suas atividades farmacológicas encontram-se as ações imunossupressora e anti-HIV; antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella typhosa, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Sarcina* e *Candida albicans*; hipoglicemiante e antiparasitário (MATOS, 2002).

Popularmente a *M. charantia* é utilizada em diferentes sistemas de medicina tradicional para várias doenças pelas suas propriedades (FIGURA 2): antiviral; antitumoral; antileucêmica; antimutagênica; antimicrobacteriana; antioxidante; antiulcerosa; antiinflamatória; hipocolesterolêmica; hipotrigliceridêmica; hipotensora; imunoestimulante, inseticida e um efeito antihiperlipidêmico, justificando a atenção de pesquisadores sobre esta planta (NG et al., 1992; RAMAN; LAU, 1996; BASCH et al., 2003).

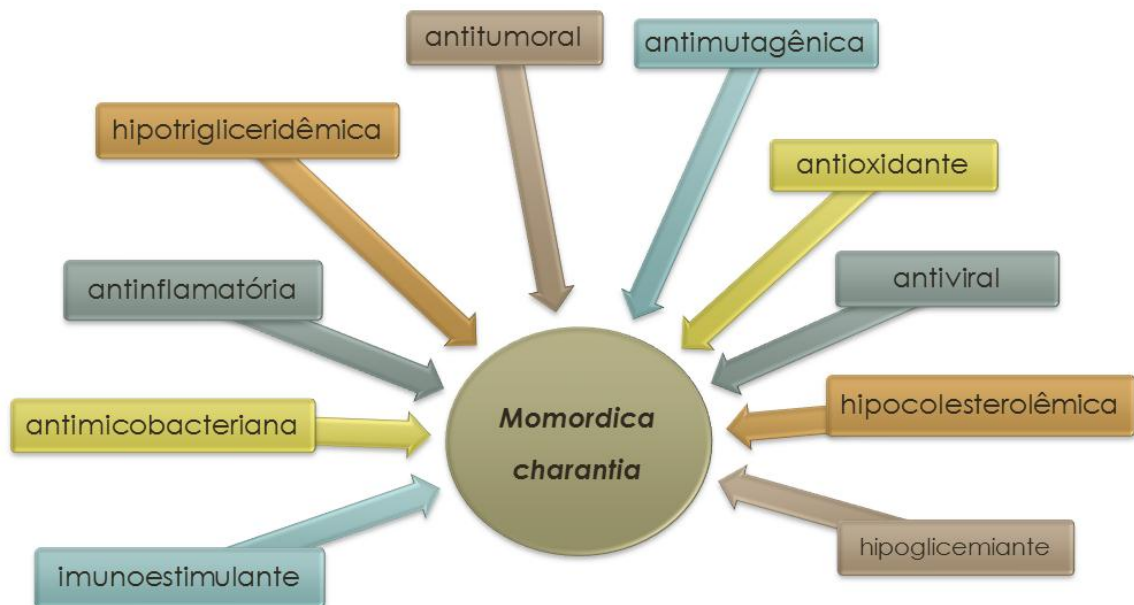


FIGURA 2 – Propriedades medicinais da *Momordica charantia*.

Fonte: autor.

A *Momordica charantia* é utilizada como alimento funcional para prevenir e tratar diabetes e complicações associadas pela Ayurvretica (medicina tradicional indiana). Seu fruto é amplamente utilizado na medicina popular como remédio para diabetes, especificamente na Índia, China, e América Central (NERURKAR; RAY, 2010).

De acordo com Grove e Yadav (2004) mais de 100 estudos utilizando técnicas modernas autentica seu uso em diabetes e nas suas complicações

(nefropatia, catarata, resistência à insulina), como antibacteriana, assim como agente antiviral (incluindo infecção pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV), como vermífugo e abortivo. Mais importante, os estudos têm mostrado sua eficácia em vários tipos de câncer (leucemia linfóide, linfoma, coriocarcinoma, melanoma, câncer de mama, tumor de pele, câncer de próstata, carcinoma epidermóide de língua e laringe, carcinomas de bexiga humana e da doença de Hodgkin). Tradicionalmente, *M. charantia* tem sido utilizada no tratamento de úlceras pépticas, curiosamente em recentes estudos experimentais têm se demonstrado o seu potencial contra a *Helicobacter pylori*.

Atualmente a *M. charantia* é estudada como remédio complementar no tratamento do diabetes tanto para reduzir os níveis de glicose e como antioxidante no combate ao estresse oxidativo, como terapia antiviral para infecção por HIV, como citostático em certos tipos de câncer, bem como antiprotozoários contra *Trypanosoma*, *Plasmodium* spp e *L. donovani* (GUPTA et al., 2010).

2.5.3 Produtos homeopáticos de *Momordica charantia*

Os produtos obtidos conforme a farmacotécnica homeopática por não possuírem experimentação patogenética em indivíduos humanos sadios e não terem seus efeitos mentais gerais e físicos descritos na matéria médica homeopática e no repertório, a rigor não são conhecidos como medicamentos homeopáticos. A utilização de modelos *in vitro* visa não só mostrar sua ação farmacológica como também avaliar sua qualidade.

2.6 MODELOS *IN VITRO* UTILIZADOS PARA TESTAR A QUALIDADE DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE *Momordica charantia*

Os medicamentos homeopáticos, preparados segundo a farmacotécnica homeopática, apresentam evidências de terem alguns efeitos sobre o sistema

imunológico e a inflamação. Eles são capazes de "regular" ou "induzir" a resposta do corpo, orientando todo o sistema hemodinâmico envolvido na doença, tornando-se um fator determinante no resultado final da reação, e não que atue direta ou dramaticamente como um inibidor químico de uma enzima (BELLAVITE et al., 2006).

Para Bellavite et al. (2006) ensaios *in vitro* podem ser propostos com o objetivo de preencher a lacuna existente na farmacotécnica homeopática. Porém, não há ainda consenso que levem a definição de modelos laboratoriais que garantam o controle de qualidade após a preparação dos medicamentos homeopáticos.

Nesta dissertação algumas técnicas foram utilizadas para se avaliar a qualidade dos produtos homeopáticos de *M. charantia*. Assim, abaixo se tece alguns comentários sobre esses testes.

Avaliação da viabilidade celular utilizando a técnica do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenil tetrazolium bromide) de acordo com Mosmann (1983). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela amostra em estudo no metabolismo celular de glicídeos através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas, como mostrado na FIGURA 3. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (ARAUJO et al., 2008). Pode-se assim inferir a atividade antiproliferativa/citotóxica da amostra em estudo.

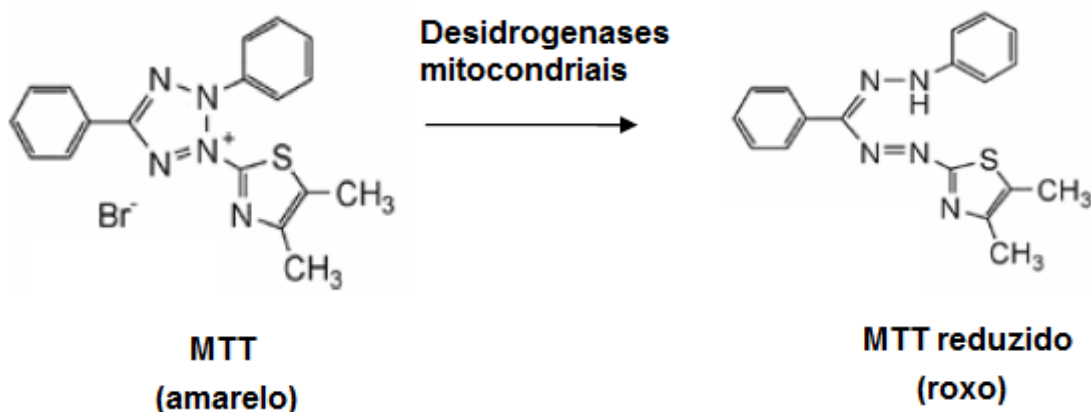


FIGURA 3 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais.

Fonte: adaptado GOMES, 2008

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas produzidas por diversos tipos de células. Desempenha papel relevante em várias áreas, como na transmissão de estímulos nervosos, na fisiologia pulmonar, na coagulação sanguínea, na defesa e imunidade, incluindo a modulação de respostas inflamatórias. Produzido em altas concentrações atua como uma molécula citotóxica contra fungos, bactérias, protozoários e células tumorais. Sua liberação produz outras consequências biológicas, as quais incluem vasodilatação e danos aos tecidos do hospedeiro, resultando em apoptose, lesão tecidual e dor. (MONCADA et al., 1991).

Seus metabólitos ativos, como nitrito, nitrato, nitrosaminas e, principalmente, peroxinitrito, ânion citotóxico formado pela reação do NO com o superóxido são responsáveis por muitos dos seus efeitos tóxicos, como inibição da respiração mitocondrial e danos a proteínas e DNA. Como resultado, ocorrem alterações genéticas, perda da função proteica, necrose e apoptose (LIMA et al., 2008).

Para quantificar NO em soluções, inclusive em meio de cultura celular utiliza-se um reagente muito difundido, conhecido como reagente de Griess (sulfanilamida e alfa-naftilamina). Este reagente na presença de nitritos originados do NO se transforma em um sal de diazônio que apresenta uma solução de cor vermelha/rosa (azo composto), como mostrado na FIGURA 4.

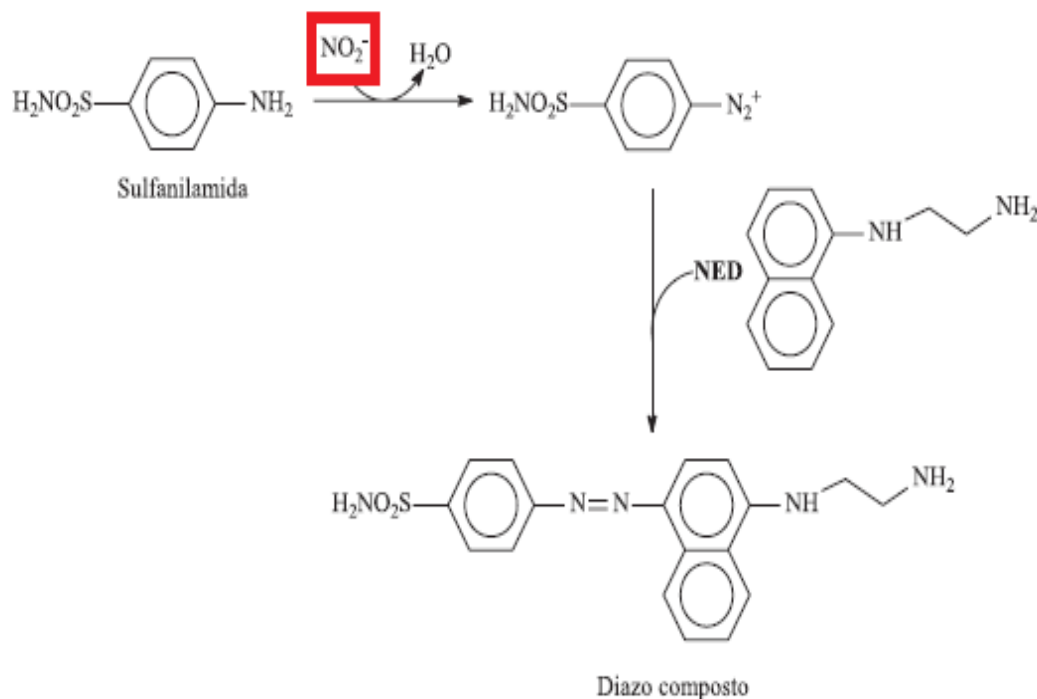


FIGURA 4 - Mecanismo de reação do nitrito com reagente de Griess.

Fonte: adaptada RAMOS et al. 2006.

O TNF- α é uma glicoproteína que desencadeia uma grande variedade de respostas biológicas, incluindo inflamação aguda e crônica na sua fase inicial, proliferação, diferenciação e morte celular. No processo inflamatório ele age como um dos principais moduladores deste processo, o TNF- α tem ações diretas sobre a destruição tecidual e reparação de lesões, além disso, regula a expressão de moléculas de adesão, induz liberação de outras citocinas de resposta precoce dentre elas a IL-6, promove ativação de citocinas quimiotáticas específicas para leucócitos (quimiocinas) e estimula a produção de NO em macrófagos. (MATOS, 2008).

A Interleucina 6 (IL6) é produzida e secretada por células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos e principalmente por adipócitos em especial pelo tecido adiposo visceral. Ela desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual. Além disso, ela atua como mediadora central da resposta de fase aguda inflamatória e é a principal citocina pró-coagulante (VOLP et al., 2008).

Também é relatado por Volp et al. (2008) que tanto o TNF- α quanto a IL6 determinam a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de proteína C reativa, que clinicamente é um marcador de processo inflamatório.

A detecção do TNF- α e de IL-6 produzidos por células em cultura, na presença de moléculas ativadoras como LPS, pode ser detectada por ensaio imunoenzimático com uso da técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) tipo sanduiche, que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas, aonde as microplacas vem previamente sensibilizada com antígeno a ser pesquisado (TNF- α ou IL6). É adicionado o sobrenadante de cultura de célula com o anticorpo a ser pesquisado. Um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado, chamado conjugado. Este é detectado por reação da enzima com o substrato colorimétrico, sendo a absorbância lida em espectrofotômetro multicanal de fibras óticas para microplacas. A intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente e permite mensurar até pequenas quantidades de antígeno.

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para investigação tanto de células integras quanto de seus constituintes, como organelas, núcleos e

membranas citoplasmáticas. Permite estudos funcionais dentre eles taxas de proliferação celular e análise de ciclo celular (DE LIMA, 2005).

Uma das técnicas mais difundidas para se avaliar o efeito de substâncias, inclusive medicamentos e produtos homeopáticos, para avaliação de sua atividade antiproliferativa frente a linhagens celulares e indução de morte celular foi desenvolvida utilizando anexina V marcada com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) que permite detectar os estágios iniciais da apoptose por se ligar preferencialmente a fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, e o iodeto de propídio (PI), que permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular por ser um marcador que interage com o DNA, mas que não é capaz de atravessar a membrana plasmática, devido ao seu caráter polar. Assim, esta marcação positiva para PI indica que há poros na membrana, fenômeno característico de processos de necrose ou estágios finais de apoptose, podendo analisar morte e ciclo celular (PEC et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar a qualidade de produtos homeopáticos contendo *Momordica charantia* folha e fruto em 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30CH e suas respectivas TM através de ensaios *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção dos produtos homeopáticos
- Avaliação dos produtos em diferentes ensaios *in vitro*:
 - ✓ Estudo da citotoxicidade em macrófago
 - Avaliação da atividade citotóxica em células RAW 264.7 pelo ensaio com MTT;
 - Seleção dos produtos homeopáticos para verificar sua ação imunomoduladora;
 - ✓ Estudos de imunomodulação.
 - Avaliação da capacidade dos produtos homeopáticos selecionados em influenciar na liberação de óxido nítrico (NO), TNF- α e IL6 pelas células RAW 264.7.
 - ✓ Estudo da atividade citotóxica frente a células tumorais.
 - Avaliação da atividade citotóxica frente às células HeLa, CHO K1, PANC-1 e PC-3 pelo ensaio com MTT;
 - Seleção dos produtos homeopáticos com melhor potencial citotóxico;
 - Seleção da linhagem celular tumoral mais sensível à ação citotóxica dos produtos homeopáticos;

Objetivos

- ✓ Analise do processo de morte e da alteração do ciclo celular através de citometria de fluxo da linhagem celular tumoral selecionada tratada pelos produtos homeopáticos selecionados.
- Propor o(s) ensaio(s) *in vitro* aplicável(is) ao Controle de Qualidade de Medicamentos Homeopáticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A *Momordica charantia* foi coletada na Fazenda Castanha (FIGURA 5), no município de Monte Alegre que fica na região do agreste do rio Grande do Norte, durante a parte da manhã. Para tal foi utilizado o critério de período de floração da planta e incidência de luz solar. Os vegetais coletados foram acondicionados em sacos de polietileno e levados ao laboratório no mesmo dia, onde sua identificação foi realizada. O material foi limpo, separado (as folhas e gavinhas (f) dos frutos e sementes (fr)).



FIGURA 5 – Coleta da *Momordica charantia*

Fonte: autor.

4.2 LINHAGENS E CULTURAS CELULARES

A linhagem não tumoral RAW264.7 (macrófago murino) e as tumorais CHO K1 (células de ovário de Hamster chinês), HeLa (adenocarcinoma cervical uterino humano), PANC-1 (carcinoma de pâncreas humano) foram mantidas em meio Dulbecco modificado - DMEN e a PC-3 (adenocarcinoma de próstata humano) foram mantidas em meio composto de mistura de sais enriquecido com aminoácidos e vitaminas - RPMI 1640. Todas as células foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), cultivadas a 37° C em uma incubadora umidificada na presença de 5% CO₂. Os meios tiveram suplementação de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

4.3 OUTROS MATERIAIS

- Álcool comercial farmacêutico adquirido na Farmácia Homeopática Officinalis;
- Etanol PA marca Vetec (Diadema, SP, Brasil);
- Meio Dulbecco modificado – DMEM; Meio composto de mistura de sais enriquecido com aminoácidos e vitaminas; - RPMI 1640; PBS-EDTA.[®]; Solução de tripsina/ EDTA 250mg% adquiridos da CultiLab (Campinas, SP, Brasil);
- MTT, solução de Nitrito de sódio 10mM preparado a partir do Nitrito de Sódio PA, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) *E. coli* Sorotipo 055B5, reagente de Griess adquirido do Sigma- Aldrich Brasil (São Paulo, SP, Brasil);
- Membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Anexina V-FITC e Iodeto de propídio adquiridos da BD Pharmingen, (San Diego, CA, USA);
- TNF alfa (mouse) EIA kit; IL-6 (mouse) EIA kit; adquiridos da Scinece Pro (São Caetano do Sul, SP, Brasil).

Todos os demais materiais e reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

4.4 APARELHOS

Além dos aparelhos usuais do laboratório pode-se destacar:

- Balança analítica - Modelo AS 220/C/2, Radwag;
- Ultrassom - Modelo UltraCleaner 750 A, Unique;
- Estufa com circulação de ar - Modelo HY-480SA, HydroSan;
- Dinamizador Comercial - Modelo Denise®, Autic;
- Microscópio óptico - Modelo CX21, Olympus;
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford, MA, USA);
- Autoclave Horizontal Digital – Modelo 20 EHD, Stermax - Stermax Produtos Médicos (Curitiba, PR, Brasil);
- Centrífuga para tubos – QUIMIS C Lab. Comércio para laboratório LTDA. (Natal, RN, Brasil);
- Banho-Maria TCM144 – Tecnal Equipamentos para Laboratório LTDA (São Paulo, SP, Brasil);
- Bancada de Fluxo Laminar Pachane Pa300 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Incubadora de CO₂ - Modelo L212, LaboVen;
- Microscópio NIKON CFI60, Spectrum – Spectrum Bioengenharia Médica Hospitalar LTDA (São Paulo, SP, Brasil);
- Mesa oscilante - Modelo TE-143-E1, Tecnal;
- Leitor de Placa - Modelo µQuanti, Biotec;
- Citômetro de Fluxo - Modelo BD FACSCANTO II, Bioscience (NJ, EUA);
- Agitador de tubos – Modelo 251, Fanen.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Preparação das tinturas mãe

A fim de se preparar as tinturas-mãe (TM) segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira (FHB) 3. ed., (FIGURA 6) foi determinado o peso total de resíduo sólido do vegetal fresco. Este por sua vez foi utilizado para se determinar o volume correto de solução alcoólica que pode ser adicionada ao material ((_f) ou (_{fr})) para se ter o volume final da TM.

As TM (_f) e (_{fr}) foram preparadas separadamente a partir de 500 g de (_f) ou 220 g de (_{fr}), a este material foi acrescentado respectivamente 250 mL ou 110 mL de álcool comercial farmacêutico (V/V). As suspensões resultantes foram acondicionadas separadamente em frascos âmbar limpos e identificadas. Após três dias conclui-se a determinação do resíduo sólido. Com este dado em mãos adicionou-se 2190 mL de álcool comercial farmacêutico e 950 mL de água destilada para a obtenção da TM (_f) e 1130 mL de álcool comercial farmacêutico e 510 mL de água destilada para se ter (TM) (_{fr}). Os frascos utilizados possuem uma capacidade de armazenamento maior do que o volume total do líquido utilizado para se fazer a TM, pois assim permitiu a realização das etapas de agitação do material durante o período de maceração. O material ficou macerando por 20 dias, em ambiente protegido da ação direta de luz e calor, a temperatura ambiente e sob agitação diária do recipiente.

Ao término deste período, o macerado (_f) foi filtrado em papel de filtro e o resíduo encontrado no filtro foi prensado com intuito de se retirar todo o líquido existente no material. Este líquido oriundo da prensagem foi também filtrado. A solução proveniente dessas duas etapas de filtração foi reunida em frasco âmbar, identificada, fechada hermeticamente e armazenada em local protegido do calor e luz direta. O mesmo procedimento foi realizado com (_{fr}). Essas soluções foram então denominadas de TM (_f) e TM (_{fr}), respectivamente.

Para preparação das TM (f) e (fr) por sonicação (FIGURA 6) as porções vegetais frescas foram pesadas 100g de (f) e 370g de (fr). Posteriormente elas foram desidratadas em estufa de secagem com circulação de ar à temperatura de 45°C por 24 horas e 72 horas respectivamente. Com o material desidratado foram preparados separadamente suspensões a 20% (P/V) em etanol PA, que por sua vez foram submetidas à extração com ultrassom na frequência de 25 KHz por 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir o material foi filtrado, acondicionado e armazenado como descrito acima.

Para realização dos ensaios o álcool presente nas TM foi retirado por evaporação sob a presença de ar comprimido, e posteriormente, o seu volume inicial novamente foi alcançado ao se adicionar água ultrapura estéril.

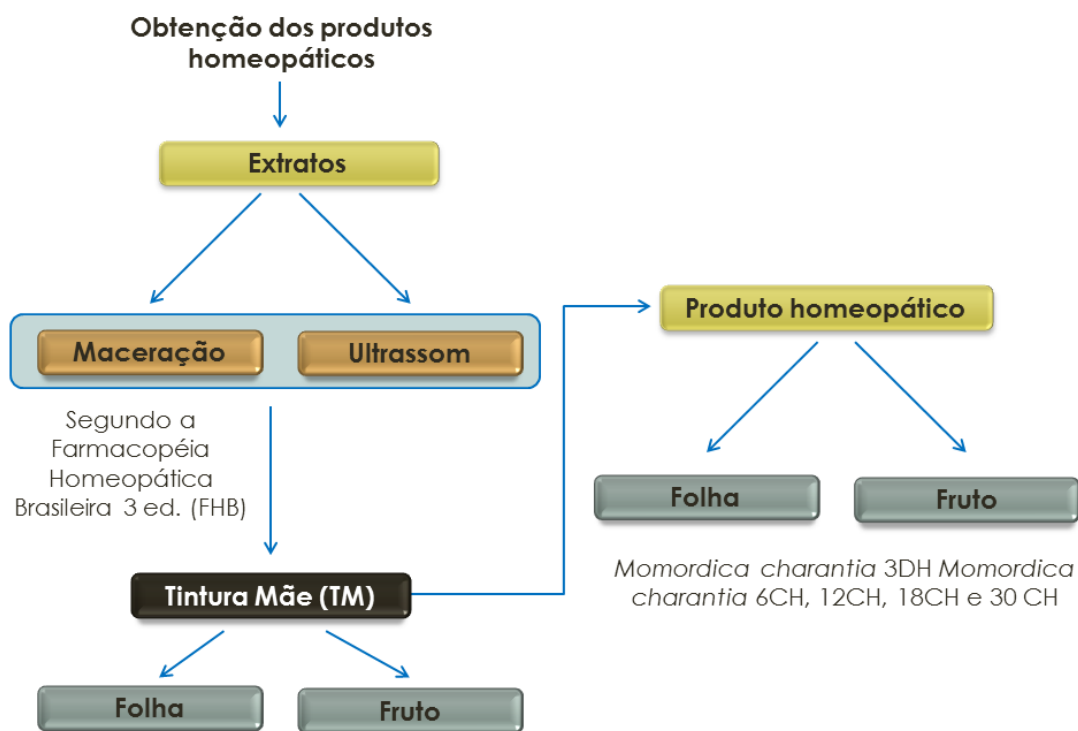


FIGURA 6 – Esquema de preparação das Tinturas mãe utilizadas na preparação dos produtos de *Momordica charantia*.

Fonte: autor.

4.5.2 Preparação dos produtos homeopáticos

Para obtenção dos produtos homeopáticos de acordo com a FHB 3. ed., foram utilizadas as TM (f) e (fr) preparadas por maceração e por sonicação. Nas três primeiras dinamizações da escala centesimal de Hahnemann (1:100) (FIGURA 7A), o título etanólico do insumo inerte foi o de 70%. A partir da 4CH até a 30CH e em todas as dinamizações da escala decimal de Hering (1:10) (FIGURA 7B) de 1DH até 3DH os produtos homeopáticos foram preparados em água ultrapura estéril. A cada diluição o frasco era submetido a 100 sucussões mecânicas (dinamização).

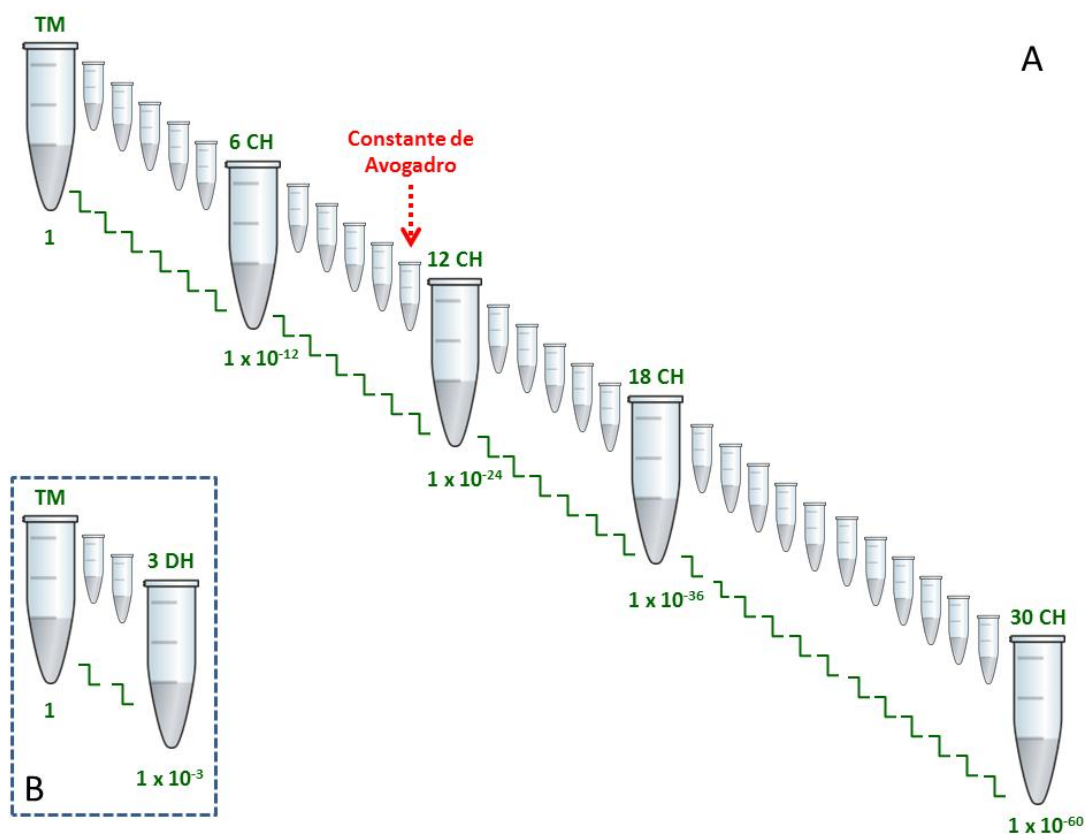


FIGURA 7 - Esquema de obtenção a partir de TM de folha e fruto de produtos homeopáticos de *Momordica charantia*; **A**: na escala centesimal de Hahnemann (cada Z corresponde a uma diluição de 1/100); **B**: na escala decimal de Hering. (cada Z corresponde a uma diluição de 1/10).

Fonte: autor.

Os produtos homeopáticos utilizados neste trabalho foram: *Momordica charantia* (f) 6CH, 12CH, 18CH, 30 CH e 3DH *Momordica charantia* (fr) 6CH, 12CH, 18CH, 30 CH e 3DH.

4.5.3 Teste de MTT

A análise da citotoxicidade dos produtos homeopáticos preparados por maceração e sonicação, (*Momordica charantia* (f) TM, 3DH, 6CH, 12CH 18CH e 30 CH, *Momordica charantia* (fr) TM, 3DH, 6CH, 12CH 18CH e 30 CH) e água ultrapura estéril dinamizada com 100 succussões frente às linhagens celulares não tumorais RAW264.7 e tumorais HeLa, CHO-K1, PANC-1 e PC-3, foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT (FIGURA 8).

Aproximadamente 5×10^3 células foram colocadas em placa estéril de 96 poços para um volume final de 100 μ L de Meio composto de mistura de sais enriquecido com aminoácidos e vitaminas (RPMI 1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para PC-3 e Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% SFB para as demais células.

Depois de 24 horas em incubadora de CO₂ 5%, a 37 °C, o meio foi removido e as células foram carenciadas (forçadas a entrar em estágio quiescente ou de dormência - G₀) por 24 horas com meio sem soro. Posteriormente, o meio foi aspirado e as células foram estimuladas a sair de G₀ pelo acréscimo de meio com 10% de SFB contendo as amostras.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, MTT (1mg/mL) foi adicionado aos poços e este foi incubado por 4 horas em condições de cultura. A seguir, o meio foi aspirado e adicionou-se 100 μ L de etanol PA em cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. Posteriormente as soluções resultantes foram lidas no comprimento de onda de 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O cálculo da inibição da proliferação celular foi realizado em comparação com o controle contendo células não tratadas com as amostras.

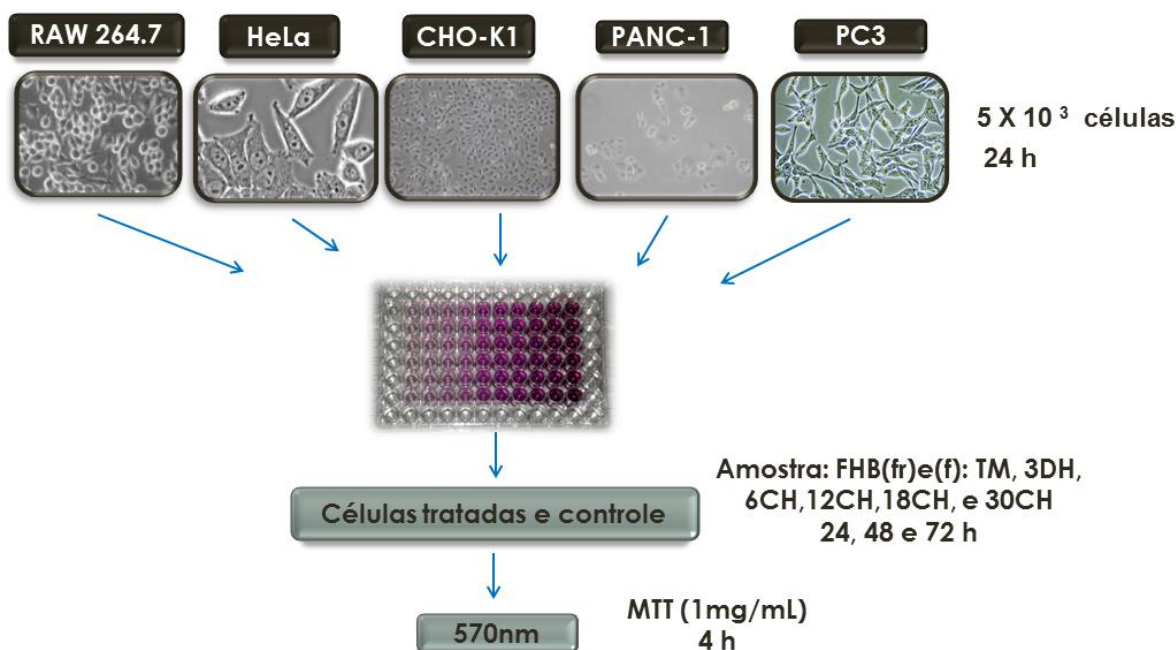


FIGURA 8 – Esquema de avaliação da citotoxicidade das linhagens celulares não tumorais e tumorais tratadas com produtos homeopáticos de *Momordica charantia* e tinturas mãe pelo teste de MTT.

Fonte: autor.

4.5.4 Quantificação de nitrito presente no meio de cultura exposto a células RAW 264.7

As células RAW264.7 foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^5 células/poço em placa estéril de 24 poços para um volume final de 500 μ L de DMEM suplementado com 10% SFB. Após 24 horas de incubação a 37 °C, 5% CO₂, o meio foi removido e elas foram carenciadas por 24 horas. Posteriormente, o meio foi aspirado e as células foram estimuladas a sair de G₀ pelo acréscimo de DMEM com 10% SFB enriquecido com as amostras (*M charantia* (f) TM, 3DH, 12CH e 30 CH, *M charantia* (fr) TM, 3DH, 12CH, e 30 CH) e água ultrapura estéril na presença ou ausência de 2 μ g/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), sendo o controle positivo (meio com LPS) e o controle negativo (meio). Depois de 24 horas em condições de cultura, foram transferidos 100 μ L de cada poço para placa nova de 96 poços e a estes foram adicionados 100 μ L de reagente de

Griess e após 5 a 10 minutos as leituras foram feitas a 540 nm. Para a determinação da quantidade de NO produzido pelas células fez-se uma curva com Nitrito de sódio. O teste foi feito em triplicata (FIGURA 9).

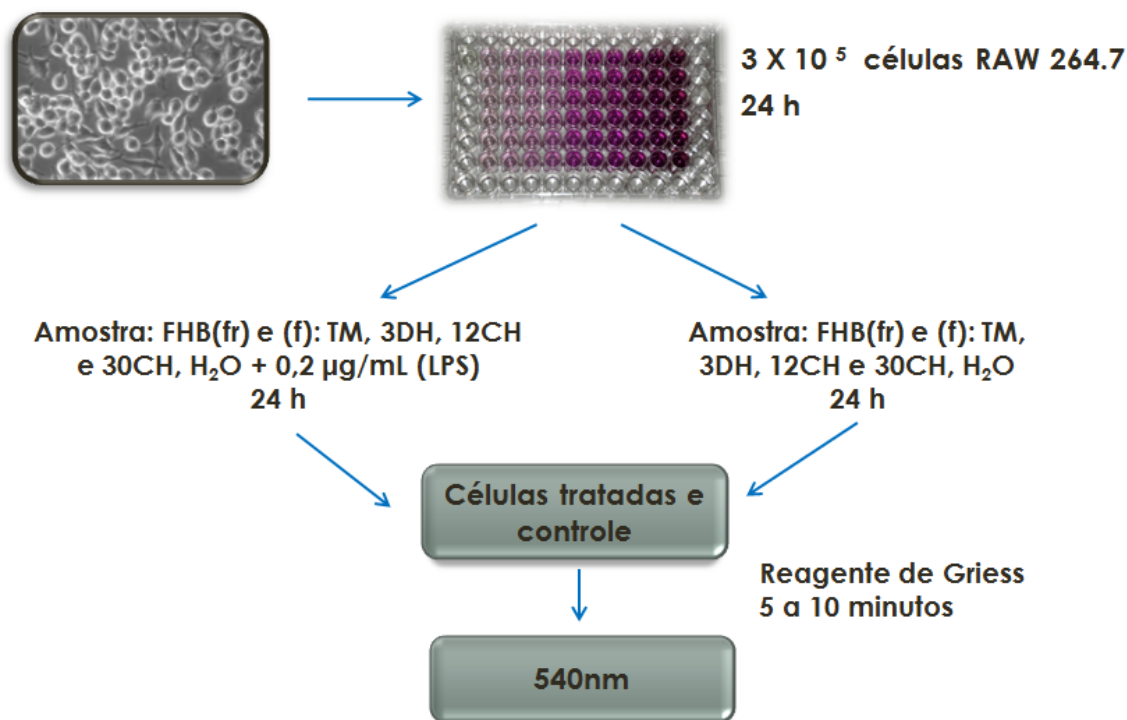


FIGURA 9 – Esquema da quantificação de nitrito presente no meio de cultura exposto a células RAW 264.7 na presença e ausência de LPS tratadas com produtos homeopáticos de *Momordica charantia* e tinturas mãe.

Fonte: autor.

4.5.5 Dosagem de biomarcadores inflamatórios TNF- α e IL6

As células RAW264.7 foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^5 células/poço em placa estéril de 24 poços para um volume final de 500 μ L de DMEM suplementado com 10% SFB. Após 24 horas de incubação a 37 °C, 5% CO₂, o meio foi removido e elas foram carenciadas por 24 horas. Posteriormente, o meio foi aspirado e as células foram estimuladas a sair de G₀ pelo acréscimo de DMEM suplementado com 10% SFB enriquecido com as amostras (*M charantia* (f)

TM, 3DH, 12CH e 30 CH, *M charantia* (fr) TM, 3DH, 12CH, e 30 CH) e água ultrapura estéril na presença de 2 µg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), sendo o controle positivo (meio com LPS) e o controle negativo (meio). Depois de 24 horas em condições de cultura, foram transferidos 25 µL de cada poço para placa nova de 96 poços e a seguir a dosagem foi realizada pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA seguindo as orientações fornecidas no kit de acordo com o fabricante (FIGURA 10).

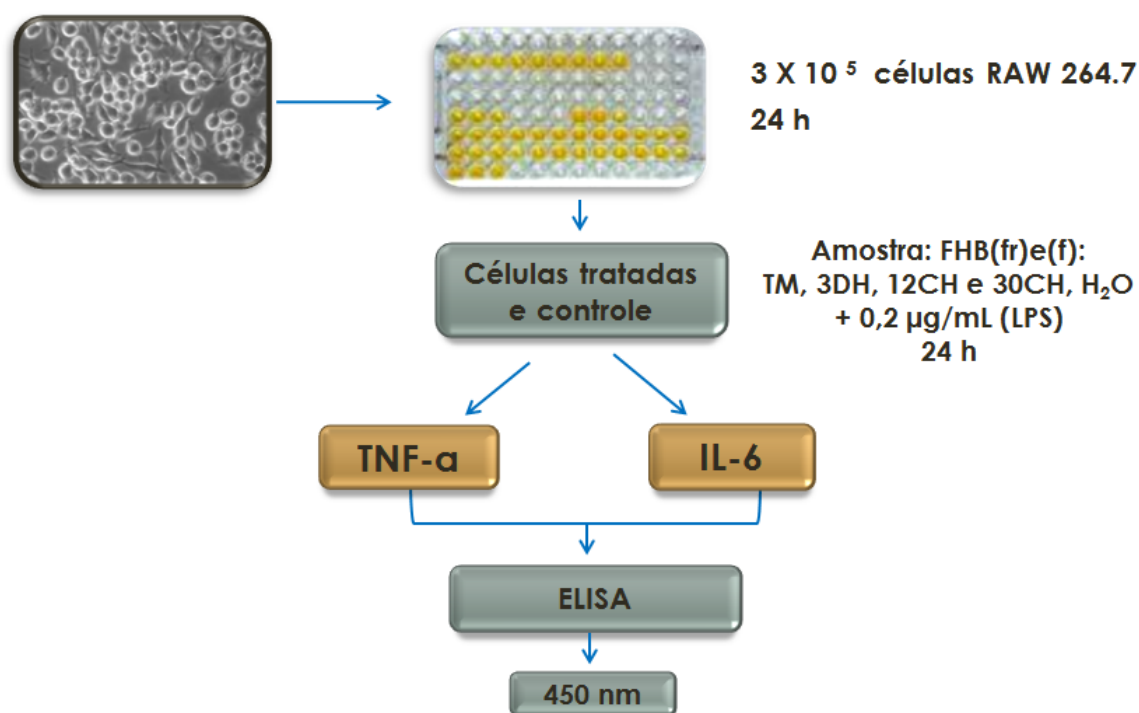


FIGURA 10 – Esquema da dosagem da liberação de biomarcadores inflamatórios TNF-α e IL6 por células RAW 264.7 na presença de LPS tratadas com produtos homeopáticos de *Momordica charantia* e tinturas mãe.

Fonte: autor.

4.5.6 Análises por citometria de fluxo

4.5.6.1 Avaliação da morte celular por Anexina V-FITC/ iodeto de propídio (PI)

Para avaliar a morte celular, foi utilizado kit de Anexina V-FITC/PI para detecção de apoptose, de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações (BD Pharmingen, San Diego, CA). Para tal, (FIGURA 11) células PC-3 foram plaqueadas em uma concentração de 2×10^5 células/poço em placa estéril de seis poços em volume final de 1,5mL de RPMI suplementado com 10% SFB. Após 24 horas em condições de cultura, as células foram carenciadas por 24 horas. Posteriormente, o meio foi aspirado e as células foram estimuladas a sair de G₀ pelo acréscimo de RPMI com 10% SFB e as amostras.

Depois de 24 e 48 horas de tratamento foi coletado o meio sobrenadante de cada poço, sendo as células lavadas duas vezes com PBS, tripsinadas e coletadas, e então submetidas à marcação com anexina e PI conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo. O perfil de marcação foi determinado com 30.000 eventos.

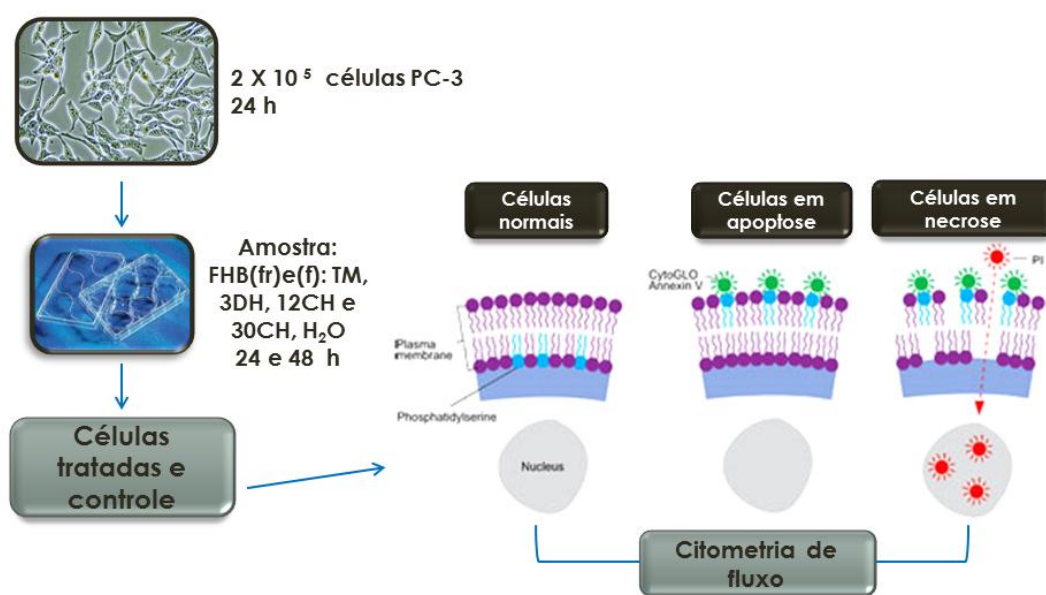


FIGURA 11 – Esquema de avaliação do efeito na morte e no ciclo das células PC-3 tratadas com produtos homeopáticos de *Momordica charantia* e tinturas mãe.

Fonte: autor.

4.5.6.2 Ciclo celular

As células PC-3 tratadas com os produtos homeopáticos como descrito acima (FIGURA 11) foram ressuspensas em PBS e fixadas com paraformaldeído 2% a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, elas foram lavadas com PBS, e então incubadas com 90 µL de saponina 0,05% e 10 µL de RNase (4 mg/mL) em PBS a temperatura de 37 °C por pelo menos 40 minutos. Posteriormente, 3 µL de iodeto de propídio (25 mg/mL) em 200 µL de PBS foram adicionadas. Logo após as células foram levadas para leitura no citômetro de fluxo FACSCANTO II. A quantidade de DNA presente em cada análise é referente à aquisição de 30.000 eventos para cada amostra. Foram feitos dois experimentos em separado, contendo duplicatas.

4.5.7 Seleção dos modelos aplicáveis ao controle de qualidade de produtos homeopáticos

Após avaliação dos dados obtidos pelos testes realizados com modelos celulares e produtos dinamizados de *Momordica charantia* (fr) e (f) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30CH e suas respectivas TM, foram escolhidos aqueles que apresentaram efeitos significativos para serem analisados quanto à sua capacidade de desempenho consistente.

A linearidade foi o parâmetro escolhido para esta análise, pois permite fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame. Assim, os dados referidos anteriormente foram plotados em função das respostas apresentadas e obtidas as representações gráficas de regressão linear. Desta forma podem-se avaliar as correlações lineares entre as diferentes diluições e dinamizações frente aos referidos modelos celulares.

É importante ressaltar que o mecanismo de obtenção da diluição de 3DH diferencia-se em números da dinamização, isto é corresponde 30 vezes diluído e 300 dinamizações / succussões. Para os demais produtos o número de diluição é o mesmo de dinamizações / succussões (FIGURA 12).

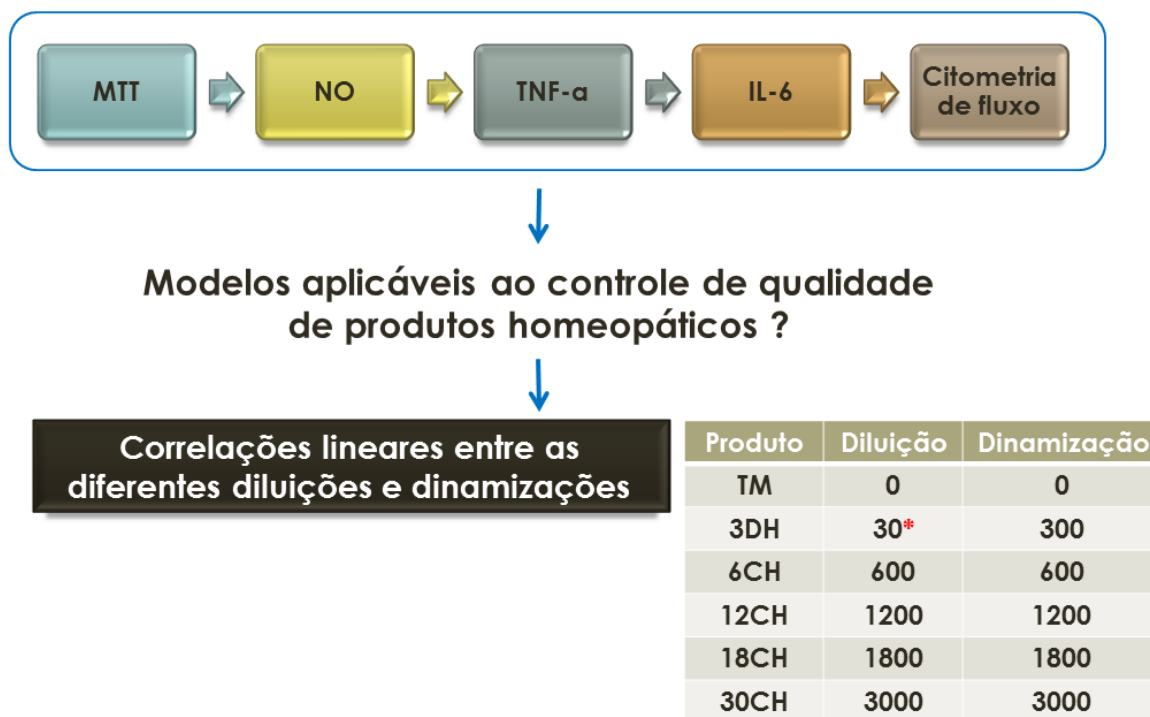


FIGURA 12 – Esquema da seleção dos modelos aplicáveis ao controle de qualidade de produtos homeopáticos de *Momordica charantia* e tinturas mãe.

Fonte: autor.

4.5.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os programas GraphPad Prism InStat® Software versão 5.04 aplicando-se ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls (Nível de significância de $p < 0,05$ e $p < 0,001$), ou o OriginPro 5.0. Software versão 5.0. Microcal Software Inc.®, 1991/97.

Para tratar os dados da citometria de fluxo utilizou-se o programa FlowJo® Analysis Software versão 7.6.5 (Outubro, 2012), ©Tree Star Incorporation, OR, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM RAW 264.7 PELO ENSAIO COM MTT

A citotoxicidade dos produtos homeopáticos com *M. charantia* (fr) e (f) 3DH, 6CH, 12CH 18CH e 30 CH e suas respectivas TM preparadas por maceração e por sonicação foi testada frente à linhagem celular não tumoral RAW 264.7 em condições de cultura por diferentes intervalos de tempo, como mostra a FIGURA 13. Numa visão geral observa-se que o material oriundo da maceração é menos tóxico em comparação com aquelas oriundas da sonicação. Na FIGURA 8 pode-se ainda observar que em 24 horas de tratamento a maioria das amostras inibiu a proliferação celular. Em geral, comparando-se o efeito dos produtos oriundos de fruto e de folha, vê-se que estes últimos apresentam maior toxicidade. Contudo, apenas os produtos FHB TM (f), 3DH (f), 12CH (f), 30CH (f) e (fr) e US 12CH (f), 30CH (f) apresentaram efeito significativo em comparação ao controle.

Com 48 e 72 horas de experimento, observa-se que o efeito citotóxico da maioria das amostras desaparece ou diminui de potência. Vale salientar que todas as amostras na 30 CH (maior dinamização testada), principalmente com 48 horas de experimento, apresentaram uma tendência a ter efeito mitogênico. Por outro lado, as únicas amostras que tiveram efeito citotóxico significativo foram as TM (f) e (fr) tanto vindas da maceração quanto da sonicação. Porém, US TM (fr) a 72 h não apresentou efeito significativo em comparação com o controle. Outra amostra que chama atenção é a US 18CH(fr), esta apresentou uma tendência a ser citotóxica.

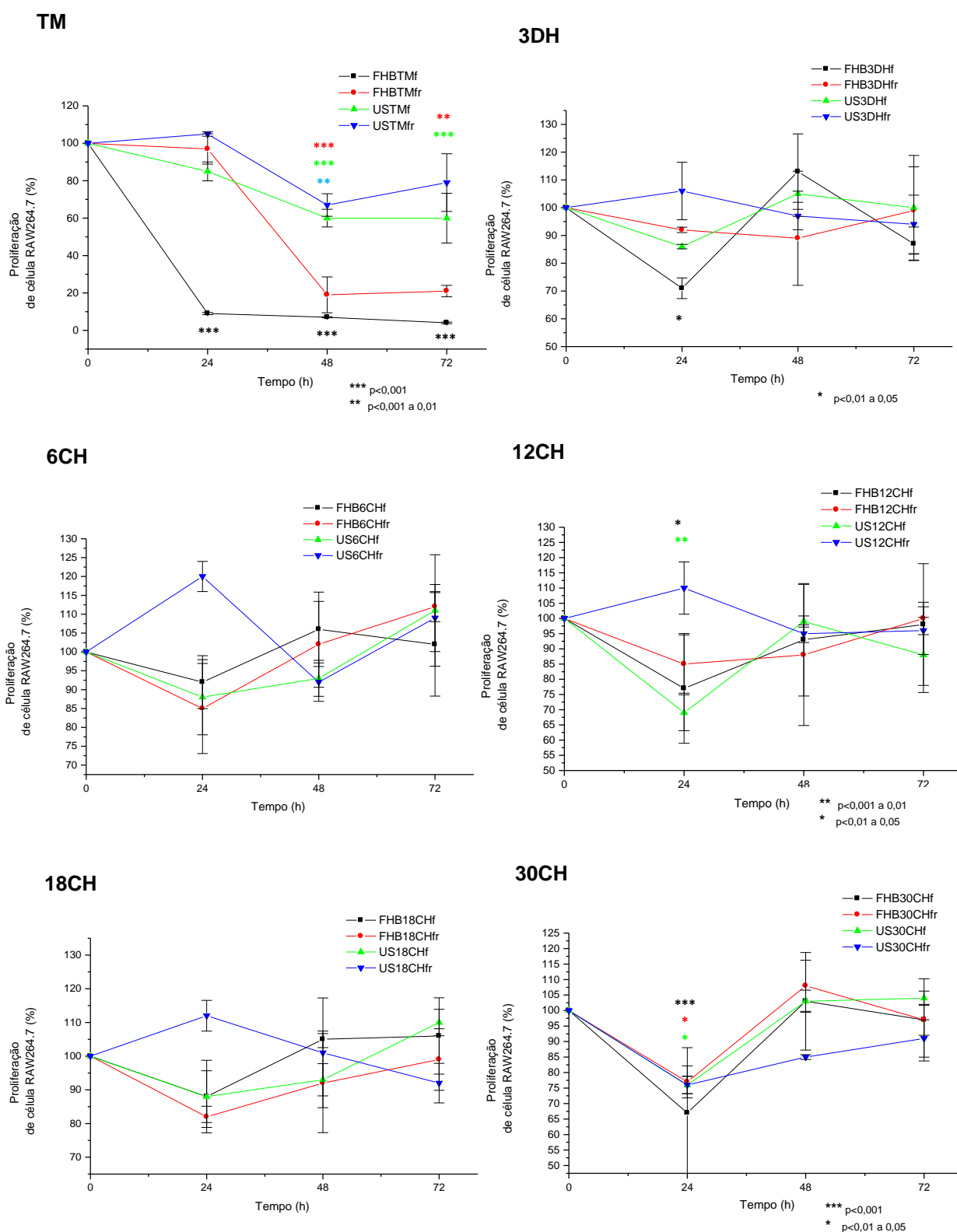


FIGURA 13 - Atividade proliferativa em linhagem celular RAW 264.7 tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e por sonicação; (A) TM (fr) e (f); (B) *M. charantia* (fr) e (f) 3DH; (C) *M. charantia* (fr) e (f) 6CH; (D) *M. charantia* (fr) e (f) 12CH; (E) *M. charantia* (fr) e (f) 18CH; (F) *M. charantia* (fr) e (f) 30CH.

A produção científica na área da homeopatia é pequena e infelizmente não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que avaliasse o efeito de produtos homeopáticos de *M. charantia* em células sob condição de cultura. Este fato fez com que não fosse possível comparar os resultados aqui apresentados com dados da literatura. Portanto, os dados desta dissertação serão comparados, quando possível, com resultados obtidos com medicamentos homeopáticos e extratos de *M. charantia* que foram publicados.

Numa revisão ampla feita por Grove et al. (2004) é mostrado que extratos metanólicos e etanólicos de *M. charantia* apresentam toxicidade frente a diversas linhagens tumorais. Portanto a toxicidade das TM avaliadas aqui não é resultado inesperado e comprova os dados anteriormente obtidos por outros autores.

Especificamente para as células RAW264.7, foi publicado um artigo que avaliou a citotoxicidade de extratos de fruto de *M. charantia* obtidos com diferentes solventes. Os dados mostram que o extrato aquoso, preparado por infusão, foi o menos tóxico dos extratos. Contudo, não foram realizados testes com extratos de folhas da planta (LII et al., 2009).

As TM (f) e (fr) de *M. charantia* apresentaram-se tóxicas para as células RAW264.7. Citotoxicidade não é uma exclusividade de *M. charantia*, TM produzidas a partir de outras plantas (*Thuya occidentalis*, *Hydrastis canadenses*, *Conium maculatum*, *Ruta graveolens*, *Podophyllum peltatum*, *Phytolacca americana*, *Chelidonium majus*, *Marsdenia condurango* e *Lycopodium clavatum*) também apresentam toxicidade frente a linhagens celulares (SUNILA et al., 2009). Contudo, como observado nesta dissertação, a dinamização dessas tinturas também diminuiu ou aboliu essa toxicidade. Vale salientar, que em algumas situações a toxidade do produto dinamizado se apresenta mais toxico que a TM, como por exemplo, foi observado que Conium 200 CH (45% de indução de morte) foi mais citotóxica do que Conium 30CH (30% de morte) e que sua TM (35 % de morte) (SUNILA et al., 2009).

Ive; Couchman e Reddy (2012) avaliaram o efeito citoprotetor de diversas dinamizações de *Arsenicum álbum* frente a células MT4 (linhagem de linfócito T humano) contaminadas com de trióxido de arsênio. Para tal, as células foram cultivadas na presença de trióxido de arsênico por 24 e 48 horas. Posteriormente, as células intoxicadas foram tratadas por 48 e 72 horas com *Arsenicum album* 6CH, 30CH e 200CH dinamizados e não dinamizados (somente diluído 1×10^{-12} ,

1×10^{-60} e 1×10^{-400}). Resultados do teste de MTT mostraram um aumento da porcentagem de células viáveis, sendo que cada amostra teve efetividade diferente, ou seja, potências diferentes tiveram diferentes efeitos sobre as células, sendo que as mais efetivas foram as potências mais diluídas (200CH>30CH>6CH). Ou seja, o produto (arsênio) em condições de determinação de massa apresenta toxicidade, por outro lado, na forma de medicamento homeopático esta toxicidade é reduzida ou desaparece.

Os dados apresentados acima corroboram com os resultados vistos nessa dissertação, ou seja, as TM de *M. charantia* apresentam alta toxicidade para as células, enquanto os produtos homeopáticos, principalmente nas maiores diluições, têm baixa ou nenhuma toxicidade.

Diferentemente do que se encontrou o *Arsenicum album*, que em 72 horas de tratamento continuou mantendo a atividade de promover aumento da viabilidade celular para as dinamizações testadas 6, 30 e 200CH, os produtos homopáticos *M. charantia* 30CH (fr) e (r) preparados por maceração e sonicação não continuaram apresentando seu efeito mitogênico. Por ser um produto oriundo de planta talvez houvesse necessidade de repetição da aplicação de uma nova alíquota da amostra, pois seu efeito não se mantém após este período. Corroboram com esta hipótese os dados apresentados por Siqueira et al. (2012). Estes autores mostraram que Influenzinum 30DH era capaz de estimular a liberação de TNF- α , mas para que o efeito se mantivesse seria necessária a administração de novas doses às células. Futuramente pretende-se realizar outros experimentos com condições que permitam comprovar esta hipótese.

Com estes dados, pode-se inferir que a dinamização contribuiu para reduzir a toxicidade dos medicamentos homeopáticos e dos produtos de *M. charantia* (fr) e (r) e permitir os efeitos curativos das doses mínimas dos medicamentos preparados de acordo com os princípios homeopáticos, isto é dinamizados.

Isto corrobora com o que é dito por Hahnemann, quando se refere à farmacotécnica e à dinamização dos medicamentos homeopáticos no Organon §269.

Por seu uso especial, o método homeopático de cura libera a um grau até agora nunca visto, os poderes medicinais internos das substâncias cruas mediante um processo próprio, e que até agora jamais foi tentado. Através desse processo estas substâncias

tornam-se imensurável e penetrantemente eficaz, mesmo as que no estado cru não dão provas da menor ação medicamentosa sobre o corpo (Hahnemann, 1994, p. 181).

5.2 DOSAGEM DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS RAW 264.7

Após análise da atividade antiproliferativa das células RAW 264.7 tratadas com os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) e as respectivas TM preparadas por maceração e por sonicação, foram selecionadas as amostras que apresentaram menor ou nenhuma toxicidade. Além disso, levou-se em consideração também, como critério de escolha, avaliar amostras que estivessem com diferentes diluições/dinamização, assim escolheu-se: 3DH (a amostra apresenta ainda elementos da TM), 12CH e 30 CH (as amostras estão acima da constante de Avogadro, não possuindo matéria). Também foram testadas a TM preparada por maceração e a água ultrapura estéril, meio inerte utilizado para preparação dos referidos produtos homeopáticos.

Na FIGURA 14 estão apresentados os resultados obtidos com as células estimuladas com LPS. Nela se pode observar que as amostras têm um efeito sinérgico ao LPS, pois em todas as condições a quantidade de NO foi superior a aquela produzida pelas células estimuladas apenas com esse lipopolissacarídeo.

As duas TM apresentaram efeito semelhante de toxicidade para as células RAW 264.7, como visto acima. Por outro lado, apenas TM (f) mostrou ação sinérgica com LPS. Este efeito foi muito intenso, cerca de cinco vezes maior que aquele observado com TM (fr), aumentando a quantidade de NO produzido pelas células (FIGURA 14B).

Ao se comparar as amostras de folha e fruto percebe-se que as preparadas a partir das folhas, em comparação as suas correlatas preparadas a partir dos frutos, são mais potentes. Por outro lado, verifica-se uma linearidade decrescente de 30CH (fr) para TM (fr), isto é, a amostra mais ultradiluída (30CH) promoveu uma maior liberação de NO para o meio em comparação com 12CH, 3DH e TM (FIGURA 14A).

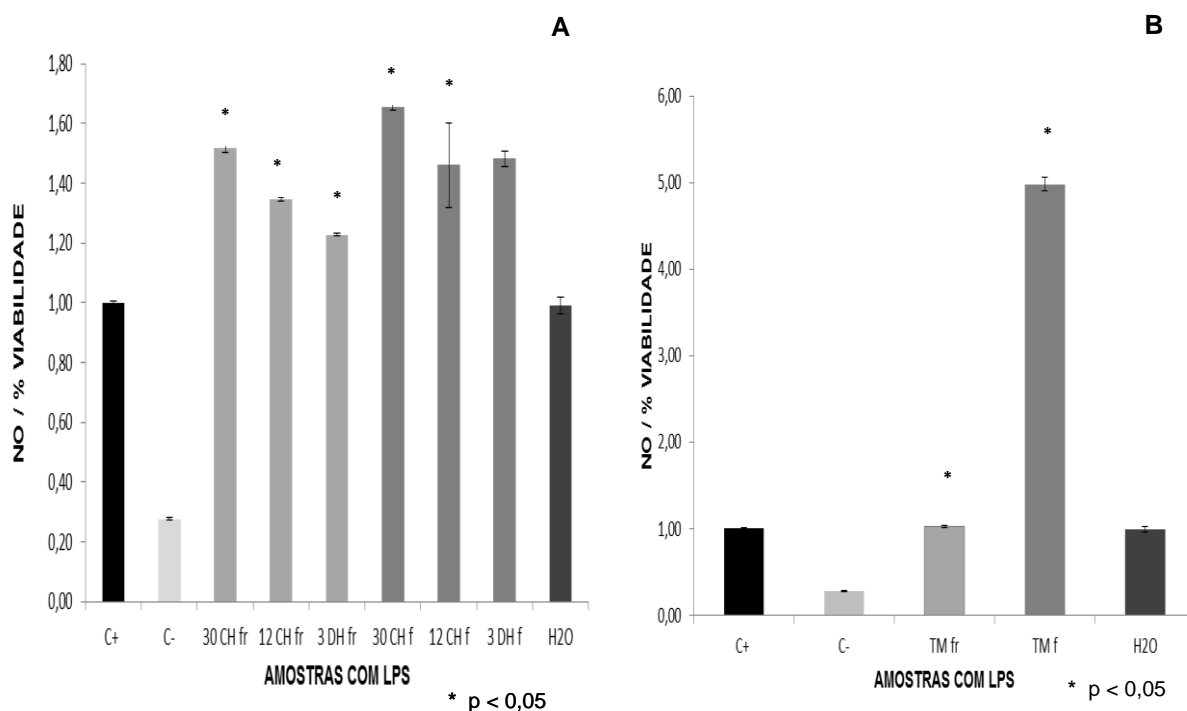


FIGURA 14 - Razão da quantidade de óxido nítrico liberado por percentual de viabilidade de células RAW 264.7 com adição de LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f).

Na FIGURA 15 são apresentados os resultados referentes à produção de NO por células RAW 264.7 expostas às amostras sem a presença de LPS. Pode-se observar que todos os produtos de *M. charantia* (fr) e (f) e a TM (fr) não estimularam a liberação de NO pelas células, ou seja, as amostras foram inertes com relação a este parâmetro (FIGURA 15A). A exceção foi a TM (f), que sozinha foi capaz de estimular a liberação de NO em quantidade, sendo seu efeito duas vezes maior que o efeito do LPS (FIGURA 15B).

Neste experimento (FIGURA 15) a água ultrapura estéril apresentou o valor da razão de liberação de NO pelo percentual de RAW 264.7 semelhante ao controle negativo.

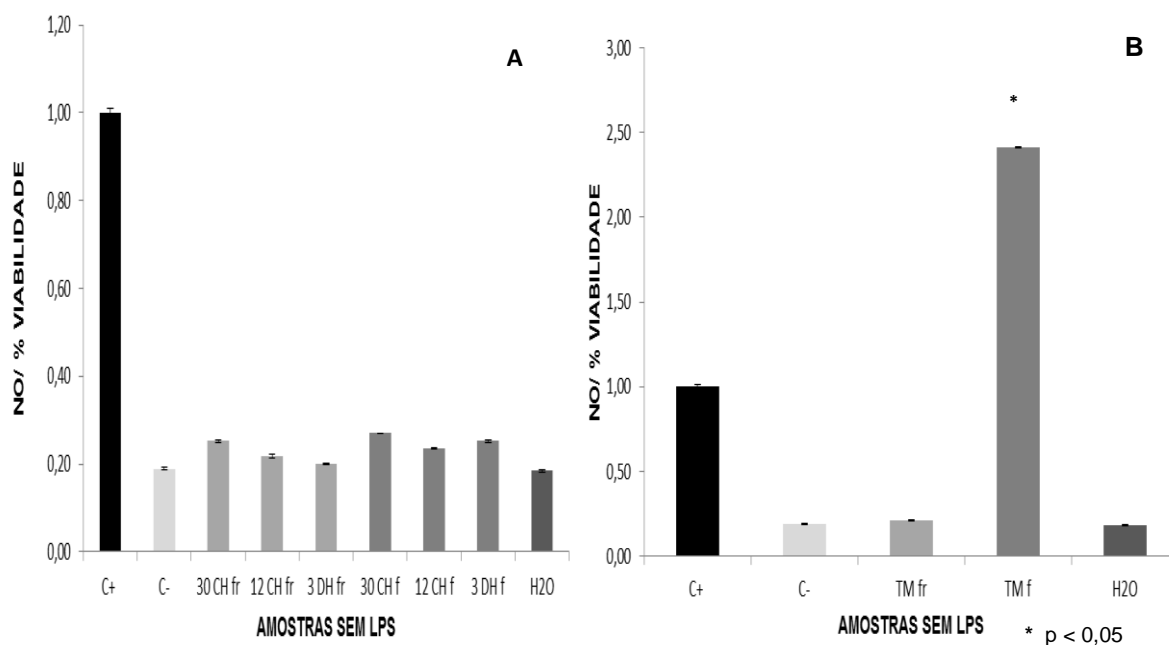


FIGURA 15 - Razão da quantidade de óxido nítrico liberado por percentual de viabilidade de células RAW 264.7 sem adição de LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f).

Lii et al. (2009) obtiveram três extratos do fruto de *M. charantia*: um infuso, um extrato alcoólico 95% e extrato obtido com acetato de etila. Quando estes extratos foram incubados com as células RAW264.7 com LPS os autores observaram que quanto maior a dose do extrato menor a produção de NO pelas células. Estes resultados são contrários aos observados com as TM (fr) de *M. charantia*, que nas condições aqui avaliadas não foi capaz de influenciar a liberação de NO. Uma possível explicação para diferença seja a constituição fitoquímica das plantas utilizadas para a obtenção dos extratos. Está bem difundido na literatura que plantas da mesma espécie, cultivadas em condições diferentes de clima e solo sintetizam moléculas em concentrações diferentes, ou até mesmo, moléculas diferentes. A planta utilizada por Lii et al. (2009) foi cultiva

na China, ou seja, ela foi cultivada em condições diferentes daquelas encontradas pela *M. charantia* cultivada no Rio Grande do Norte.

Há poucos trabalhos na literatura que avaliaram a produção de NO por macrófagos, inclusive com células RAW 264.7, na presença de medicamentos homeopáticos e nenhum foi encontrado com produtos homeopáticos de *M. charantia*.

Um dos poucos encontrados foi realizado com *Mercurius solubilis* nas dinamizações de 6, 12, 30 e 200CH. Estas amostras quando administradas em macrófagos de lavado peritoneal de camundongo foram capazes de agir sinergicamente com INF- γ e LPS, aumentando a liberação de NO por estas células. Além disso, com essas dinamizações não foi encontrado citotoxicidade, diferente do que foi observado com sais de mercúrio (DE OLIVEIRA et al., 2011). Estes dados são semelhantes aos encontrados com diferentes amostras de *M. charantia*.

Vale à pena ressaltar que nestes dois trabalhos as dinamizações estavam acima da constante de Avogadro, e mesmo assim, foram capazes de modular a liberação de NO. Outro fato importante, tem-se dois trabalhos (esta dissertação e De Oliveira et al. (2011)) que avaliaram o efeito de produtos homeopáticos na liberação de NO por macrófagos, o que pode levar a uma pergunta: todo produto homeopático estimula macrófagos a liberar NO? Devido à escassez de referencial teórico não se pode ter a resposta. Para tal, seria necessário um maior esforço por grupos de pesquisadores no intuito de avaliar os mais diversos medicamentos homeopáticos como possíveis estimuladores da liberação de NO. Estes resultados poderiam dar embasamento científico ao que é observado clinicamente, ou seja, o medicamento homeopático, quando administrado num paciente com processos inflamatórios, provoca uma resposta de melhora do seu quadro clínico.

5.3 DOSAGEM DE BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO TNF- α POR CÉLULAS RAW 264.7 COM LPS

A avaliação da liberação de TNF- α por células RAW 264.7 ativadas com LPS foi realizada pelo tratamento com os produtos homeopáticos de *M. charantia* ($_{fr}$) e ($_f$) e suas respectivas TM e com incubação de 24 horas.

As amostras testadas foram escolhidas segundo o mesmo critério adotado no ensaio para avaliar a produção do NO isto é, 3DH (amostra que apresenta ainda elementos da TM), 12CH e 30 CH (amostras que estão acima da constante de Avogadro, não possuindo matéria). Também foram testadas as TM preparadas por maceração e a água ultrapura estéril, meio inerte utilizado para preparação dos referidos produtos homeopáticos.

Os resultados encontrados para todos os produtos de *M. charantia* ($_{fr}$) e ($_f$), estão apresentados na FIGURA 16 A. Pode-se observar que todos tiveram efeito sinérgico com LPS, já que em todas as situações as quantidades de TNF- α estão acima daquela observada quando se estimulou as células apenas com LPS. O valor mais expressivo foi encontrado com 12CH ($_{fr}$), amostra ultradiluída.

Na FIGURA 16 B pode-se observar os resultados encontrados para as TM ($_{fr}$) e ($_f$) e vê-se que ambas estimularam a produção de TNF- α acima do controle positivo, sendo o maior valor encontrado na TM ($_f$). Este aumento é cerca de 10 vezes maior do que o encontrado para as amostras dinamizadas.

A água ultrapura estéril não afetou a liberação de TNF- α .

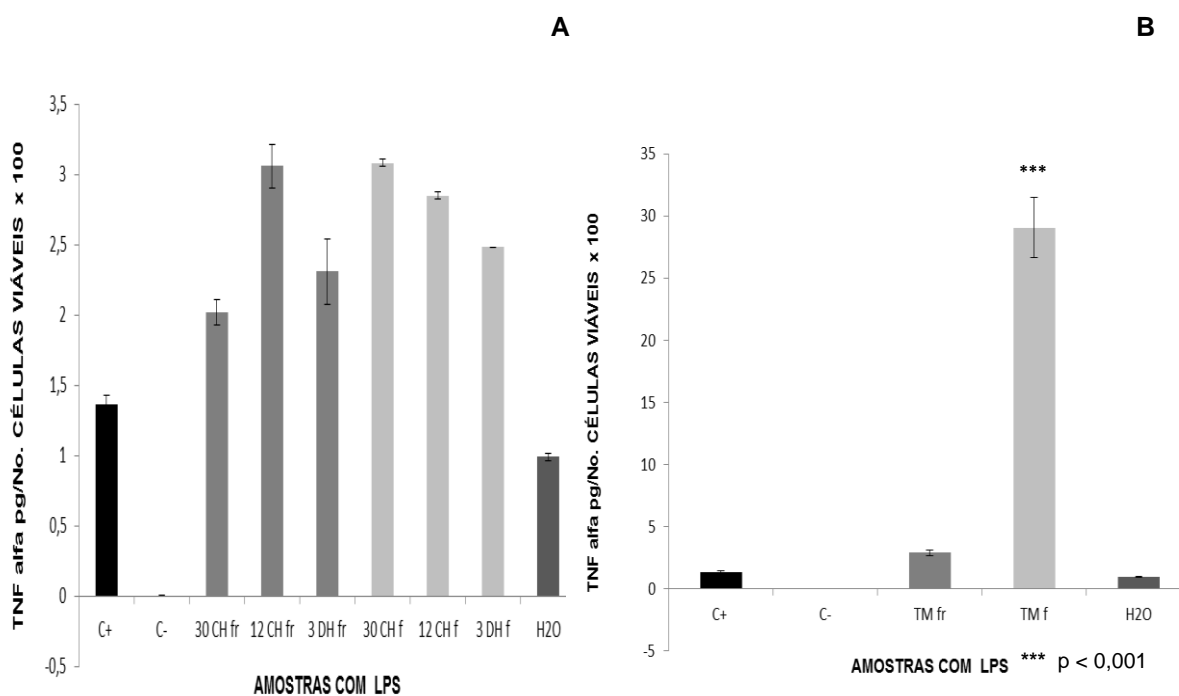


FIGURA 16 - Razão da quantidade de TNF- α liberado por número de células RAW 264.7 viáveis com LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), Produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f).

Poucos referenciais teóricos foram encontrados na literatura que avaliaram a produção de TNF- α por células RAW 264.7 tratadas com extratos de *M. charantia*. Porém, pode-se citar o trabalho de Korobi et al., (2008), no qual os autores trabalharam com amostras preparadas a partir de extrato do fruto com etanol 80%, concentrado, liofilizado e ressuspensão em água destilada. Este extrato aquoso foi separado com acetato de etila e a fração aquosa foi partilhada em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 μ g/ml) com butanol, que a seguir foi extraído e as frações ressuspensas em água destilada. As amostras foram usadas para tratar células RAW 264.7 em condição de cultura com LPS para determinar a produção de TNF- α pelo método ELISA de acordo com as instruções do fabricante Bioscience.

Uma análise dos dados obtidos levou aos autores proporem que o extrato aquoso não afeta a liberação de TNF- α pelas células. Por outro lado, o extrato butanólico diminui a liberação de TNF- α de forma dose-dependente.

Estes resultados levam a crer que o fruto de *M. charantia* apresenta ativos que são capazes de estimular a liberação de TNF- α . Porém, estes são compostos de polaridade intermediária, que, portanto, não podem ser extraídos com água, mas sim por um solvente menos polar, como butanol. O que pode explicar a incapacidade da TM (fr), estudada aqui, em estimular a liberação de TNF- α , já que ela foi obtida com etanol, que é menos apolar que butanol, e que por isto, foi incapaz de extrair os ativos imunomoduladores encontrados no fruto.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que tivessem avaliado a produção de TNF- α por células RAW 264.7 tratadas com medicamentos homeopáticos. Contudo, foi encontrado um experimento recente que avaliou o efeito de medicamentos homeopáticos frente a outro tipo de linhagem de macrófago murinos, as células J774.G8. Neste trabalho Siqueira et al., (2013) relataram o efeito de Influenzinum RC 30 DH, um medicamento homeopático bioterápico, em doses repetidas na liberação de TNF- α pelas células sem adição de LPS após 24 horas de exposição. Os autores observaram que este medicamento estimula a liberação de TNF- α .

Não foi possível correlacionar os resultados dessa dissertação com os obtidos por Siqueira et al., (2013), pois as condições experimentais foram diferentes. No entanto, será que as amostras de *M. charantia* dinamizadas podem ser consideradas como medicamentos homeopáticos, pois apresentaram ação sobre macrófago estimulado com LPS aumentando ainda mais a produção de TNF- α , enquanto que frente às mesmas células sem LPS não foi observado qualquer alteração?

Não devemos nos esquecer de que os medicamentos homeopáticos agem no sistema imunológico promovendo sua ativação, embora ainda não esteja totalmente esclarecido este mecanismo de ação como relatam Bellavite et al., (2006).

Outro ponto importante sobre os medicamentos homeopáticos é que eles tratam os pacientes e não as doenças. Isto é, eles agem promovendo no indivíduo uma doença artificial maior que a natural, com sinais e sintomas semelhantes e desta forma restabelecendo o equilíbrio dos sistemas complexos afetados (fígado,

rim, sistema imunológico entre outros) e deste modo retornando à homeostasia que foi rompida.

É necessário maior número de trabalhos científicos para que sejam esclarecidos os mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos.

5.4 DOSAGEM DE BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO IL6 POR CÉLULAS RAW 264.7 COM LPS

O experimento para avaliar a liberação de IL6 por células RAW 264.7 ativadas com LPS foi realizado pelo tratamento com os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) e suas respectivas TM e com incubação de 24 horas.

O critério de escolha das amostras estudadas foi o mesmo adotado nos ensaios para avaliar a produção do NO e TNF- α , isto é, 3DH (amostra que apresenta ainda elementos da TM), 12CH e 30 CH (amostras que estão acima da constante de Avogadro, não possuindo matéria). Também foram testadas as TM preparadas por maceração e a água ultrapura estéril, meio inerte utilizado para preparação dos referidos produtos homeopáticos.

Os resultados que se encontram na FIGURA 17 A referem-se a todos os produtos de *M. charantia* (fr) e (f). Observa-se um aumento na liberação de IL-6 quando as células foram tratadas com as amostras. Os maiores valores encontrados foram na 30CH (f) e (fr), amostras ultradiluídas.

Na FIGURA 17 B são apresentados os resultados das TM (f) e (fr). Também se encontra um aumento da produção de IL6 acima do controle positivo, sendo discreta para TM (fr) e significativa para a TM (f).

A água ultrapura estéril não afetou a liberação de IL6.

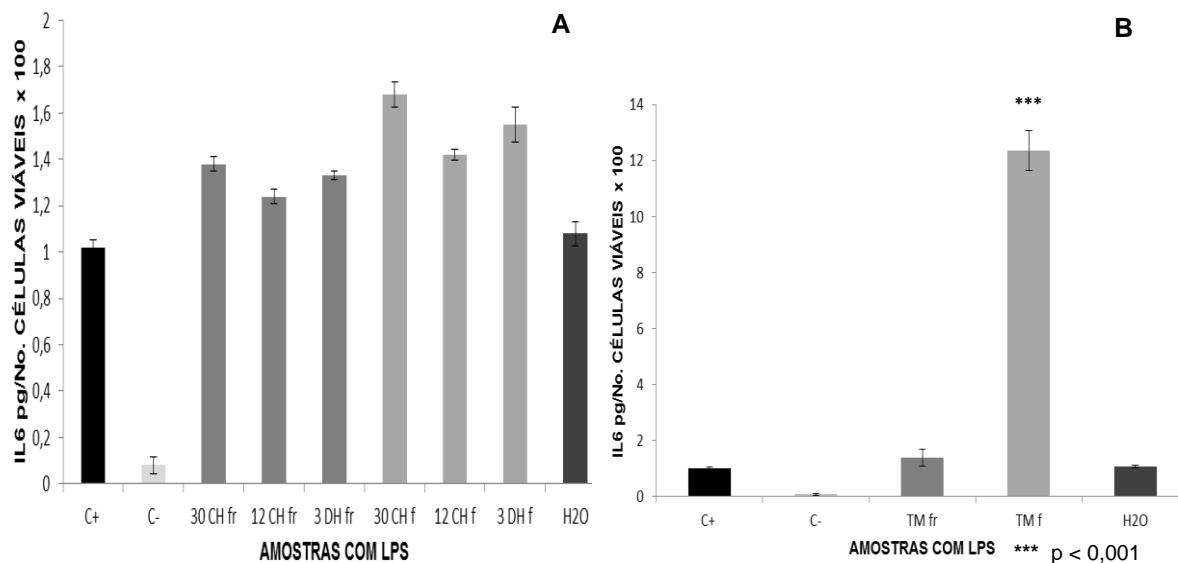


FIGURA 17 - Razão da quantidade de IL6 liberada por número de células RAW 264.7 viáveis com LPS tratadas com amostras preparadas a partir do extrato obtido por maceração e água ultrapura estéril; (A) C+ (meio com LPS), C- (meio), produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) 30CH, 12CH, 3DH; (B) C+ (meio com LPS), C- (meio), TM (fr) e (f).

Na literatura não foi encontrado referencial teórico que tenha avaliado a produção de IL-6 por células RAW 264.7 tratadas com extrato de *M. charantia* (fr) e ou (f). Contudo, um estudo recente de Nerurkar et al. (2011) avaliaram a produção de IL6 por células do plasma de camundongo C57BL/6 alimentado com dieta rica em gordura. Estes animais foram separados em dois grupos e somente um deles recebeu suco do fruto de *M. charantia* junto com a alimentação e o teste foi realizado pelo método de quimioluminescência. Nos resultados encontrados o grupo tratado com *M. charantia* apresentou uma diminuição da produção de IL6, quando comparado com o grupo com dieta rica em gordura. Porém, houve aumento da produção de IL6 quando se compara o grupo tratado com o controle. Estes achados nos levam a crer que o fruto de *M. charantia* apresenta ativos que são capazes de estimular a liberação de IL6.

Os trabalhos científicos com homeopatia são ainda escassos e não encontramos na literatura referências à avaliação da produção de IL6 por células

RAW 264.7 com LPS tratadas com medicamentos homeopáticos. Serão necessários maiores estudos para avaliar a ação dos medicamentos homeopáticos no sistema imunológico durante o processo de inflamação agudo, mediada pela secreção e liberação de IL6.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE A CÉLULAS TUMORAIS PELO ENSAIO COM MTT

Os dados até o momento levam a observação de que os produtos homeopáticos com *M. charantia* (fr) e (f) são capazes de agirem como imunomoduladores, por estimularem a liberação de NO, IL-6 e TNF- α . Compostos com estas propriedades são muitas vezes utilizados como remédios adjuvantes no tratamento de diversas doenças, inclusive câncer. Portanto, os produtos homeopáticos com *M. charantia* (fr) e (f) possuem uma potencial aplicabilidade no tratamento de diversos tipos de câncer. Porém, não há dados sobre o efeito desses produtos sobre as células cancerígenas. Assim, com intuito de preencher esta lacuna, a citotoxicidade dos produtos homeopáticos com *M. charantia* (fr) e (f) 3DH, 6CH, 12CH 18CH e 30 CH e suas respectivas TM frente a linhagens de células tumorais: HeLa, CHO-K1, PANC-1 e PC-3 e foram avaliados pelo teste do MTT.

Nas FIGURAS 18 e 19 estão apresentados graficamente os resultados obtidos com o ensaio de MTT que refletem a toxicidade das amostras analisadas. A amostra em que se observou maior efeito citotóxico e com significância em todos os tempos testados e para todas as linhagens celulares tratadas foi a TM (f). Comparando-se os produtos homeopáticos entre si, pode-se ver que os produtos de *M. charantia* (f) foram mais potentes do que os de *M. charantia* (fr). Vale também salientar que na maioria das linhagens celulares testadas observa-se efeito citotóxico em 48 horas de tratamento com os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f).

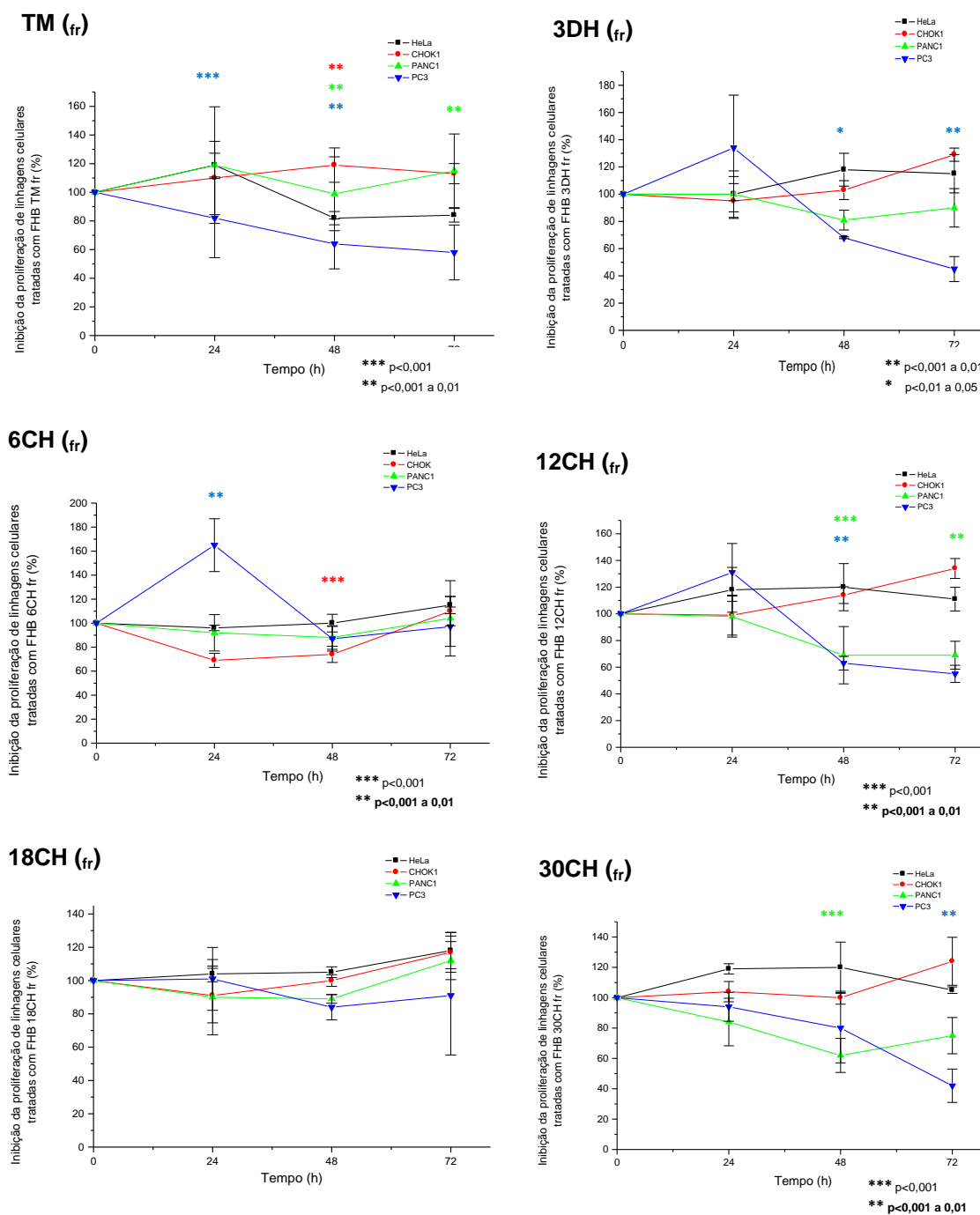


FIGURA 18 - Atividade antiproliferativa das linhagens celulares HeLa, CHO K1, PANC-1 e PC-3 tratadas com TM (fr) e produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30 CH preparados a partir do extrato obtido por maceração.

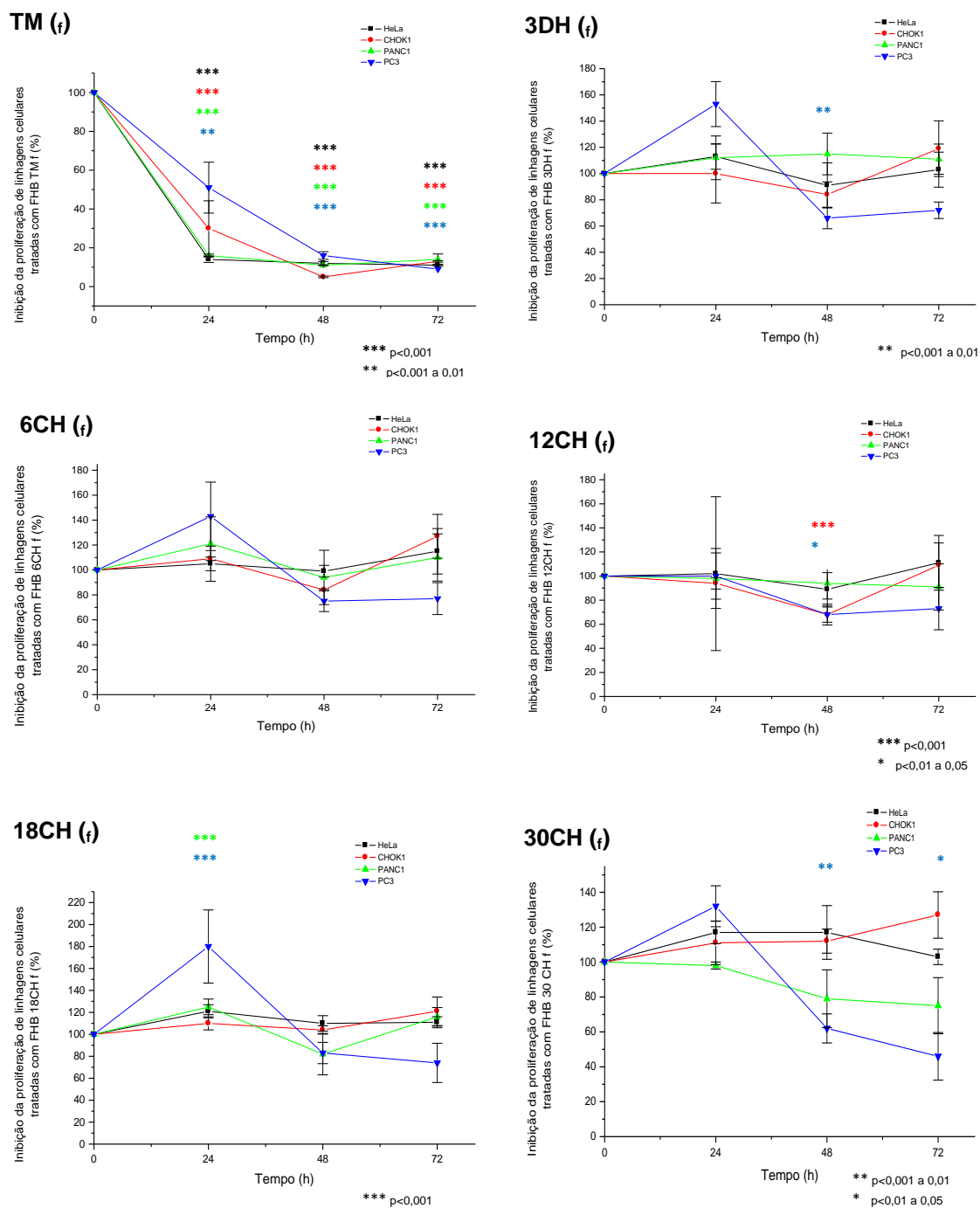


FIGURA 19 - Atividade antiproliferativa das linhagens celulares HeLa, CHO K1, PANC-1 e PC-3 tratadas com TM (f) e produtos homeopáticos de *M. charantia* (f) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH e 30CH preparados a partir do extrato obtido por maceração.

Os dados de citotoxicidade contra PC-3 obtidos com as TM (fr) e TM (f) confirmam outros dados da literatura. Limtrakul; Khantamat e Pintha (2004) avaliaram o efeito modulador dos extratos alcoólicos de *M. charantia* na ação citotóxica do fármaco consagrado vimblastina. Para tal, extratos alcoólicos obtidos por maceração a 37 °C, de fruto e folha de *M. charantia* foram obtidos e posteriormente, eles, em duas concentrações distintas (25 ou 75 µg/mL), foram incubados com células KB-V1 (carcinoma cervical humano) e KB-3-1 (carcinoma cervical humano fármaco sensível) na presença de vimblastina (1 a 4 µg/mL). Após três dias, os dados do teste de MTT mostraram que somente o extrato de folha apresentou efeito sinérgico com a vimblastina e que este foi dose-dependente.

Mais recentemente, foi demonstrado um dos princípios ativos que é responsável pela atividade citotóxica de *M. charantia* frente a células de tumor de próstata. Esta molécula é conhecida como Kuguacin J (KuJ), e ela se mostrou bastante tóxica contra células PC-3, agindo de forma dose dependente e sendo mais potente após 48 horas de exposição (PITCHAKARN et al., 2012). Provavelmente, este composto também deva estar presente nas TM (fr) e (f) o que justificaria a sua alta atividade citotóxica frente às células PC-3.

Pelo reduzido número de trabalhos científicos sobre medicamentos homeopáticos, não se encontrou na literatura algum artigo que avaliasse o efeito citotóxico de produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) em linhagens celulares, inclusive frente à linhagem celular PC-3. Porém, um estudo que avaliou a toxicidade de outros medicamentos homeopáticos: *Thuya occidentalis*, *Conium maculatum* e *Sabal serrulata* nas dinamizações de 30, 200 e 1000CH e de *Carcinosinum* 1000CH, mostrou que estes não apresentavam toxicidade frente às linhagens celulares DU154 e LN CaP (carcinoma de próstata humano) e MAT-LyLu (câncer de próstata de rato), mesmo quando estas foram expostas aos medicamentos por 96 horas (THANGAPAZHAM et al., 2006). Porém outro grupo de pesquisadores trabalhando com *Sabal serrulata* nas dinamizações de 12, 30, 100, e 200CH, 300 e 1000CK e as células DU 145 e PC-3, encontrou que apenas a dinamização 100CH apresentava citotoxicidade para as células, e já com 24 horas (MACLAUGHLIN et al., 2006).

Os resultados da literatura em conjunto com os apresentados nesta dissertação, levam a observação de que nem todos os medicamentos

homeopáticos apresentam toxicidade frente a linhagens celulares, e que esta toxicidade é algo inerente de alguns medicamentos. Contudo, para se poder afirmar que um medicamento homeopático é ou não citotóxico é necessário avaliar várias de suas dinamizações e o efeito delas frente a diferentes células.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE *Momordica charantia* (fr) E (f) E SUAS RESPECTIVAS TM NA MORTE DAS CÉLULAS PC-3

O ensaio de MTT avalia se uma amostra modifica o metabolismo oxidador das mitocôndrias celulares. O que, quando afetado negativamente, indiretamente pode ser utilizado como indicador de morte celular (MOSMANN, 1983).

Para se confirmar se os dados obtidos nos ensaios de MTT levam a morte celular, as células PC-3, as que se mostraram mais sensíveis dentre as quatro avaliadas, foram tratadas com produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) e suas respectivas TM por 24 e 48 horas, depois marcadas com anexina V / PI e avaliadas por citometria de fluxo.

Anexina V e iodeto de propídeo (PI) são dois marcadores muito utilizados para se diferenciar células em apoptose e em necrose. Geralmente, células marcadas com anexina V são indicativo de apoptose inicial, células marcadas com PI são indicativo de necrose e células positivas para anexina e PI são indicativo de apoptose tardia.

Na FIGURA 20 estão apresentados os resultados do experimento de 24 horas de incubação. Observa-se que a presença das diferentes dinamizações não provoca alteração na distribuição das células nos quatro quadrantes em comparação com a distribuição das células não tratadas. O que indica que as dinamizações não induzem morte celular após 24 horas de contato com as células PC-3, apesar de alterarem o metabolismo mitocondrial, como visto no teste de MTT.

A TM (f) foi à única amostra, que comparada ao controle, promoveu a diminuição de 97% para 0,1% as células viáveis. Também aumentou cerca de 50% a percentagem de células positivas para PI (anexina V FITC - / PI +; Q1) e positivas para anexina e PI (anexina V FITC + / PI +, Q2) o que sugere respectivamente necrose e apoptose tardia.

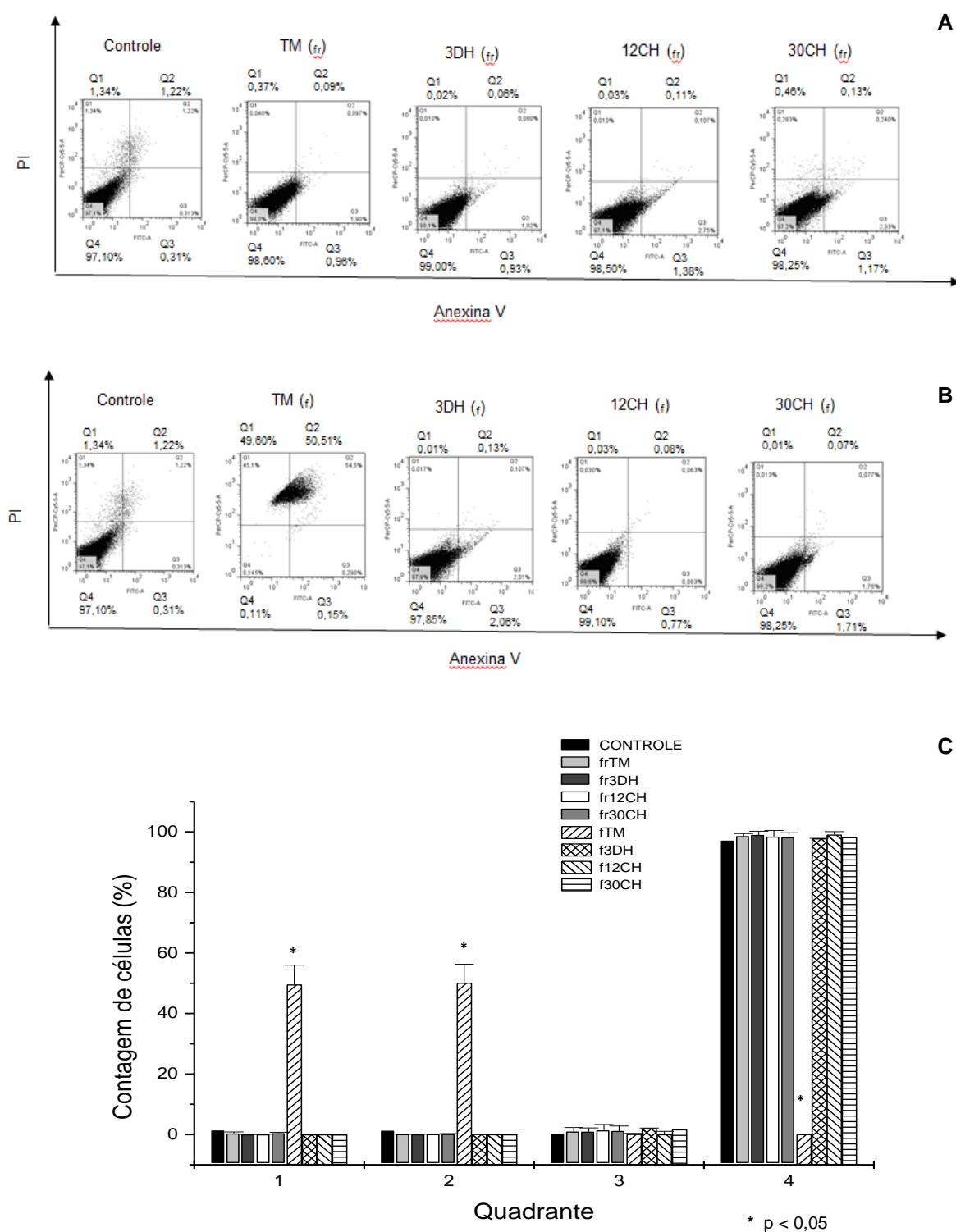


FIGURA 20 – Análise de citometria de fluxo de células PC-3 tratadas por 24 horas com produtos preparados de extrato obtido por maceração; (A) Gráfico de pontos do controle, TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Gráfico de pontos do controle, TM (f), *M. charantia* (f) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Gráfico de barras representa a média \pm desvio padrão (n=2). Anexina-/PI- (Q4), células viáveis; Anexina+/PI- (Q3), células em apoptose; Anexina+/PI+ (Q2), células em estágio final de apoptose; Anexina-/PI+ (Q1), células em necrose.

Este FACS é representativo de dois ensaios independentes

Os dados obtidos no experimento de 48 horas de tratamento são apresentados na FIGURA 21. Todas as dinamizações testadas não foram capazes de alterar a distribuição das células nos diferentes quadrantes o que indica que elas também não induzem morte celular após 48 de exposição.

A TM (f), nesta condição de experimento, também promoveu diminuição significativamente do número de células viáveis em comparação com o controle. Este número caiu de 97% para 0,8%, em contrapartida, a presença de TM (f) alterou drasticamente a percentagem de células positivas para PI (anexina V FITC - / PI +; Q1) em relação ao controle, sugerindo que nestas condições a grande maioria das células (99 %) está em estado de necrose.

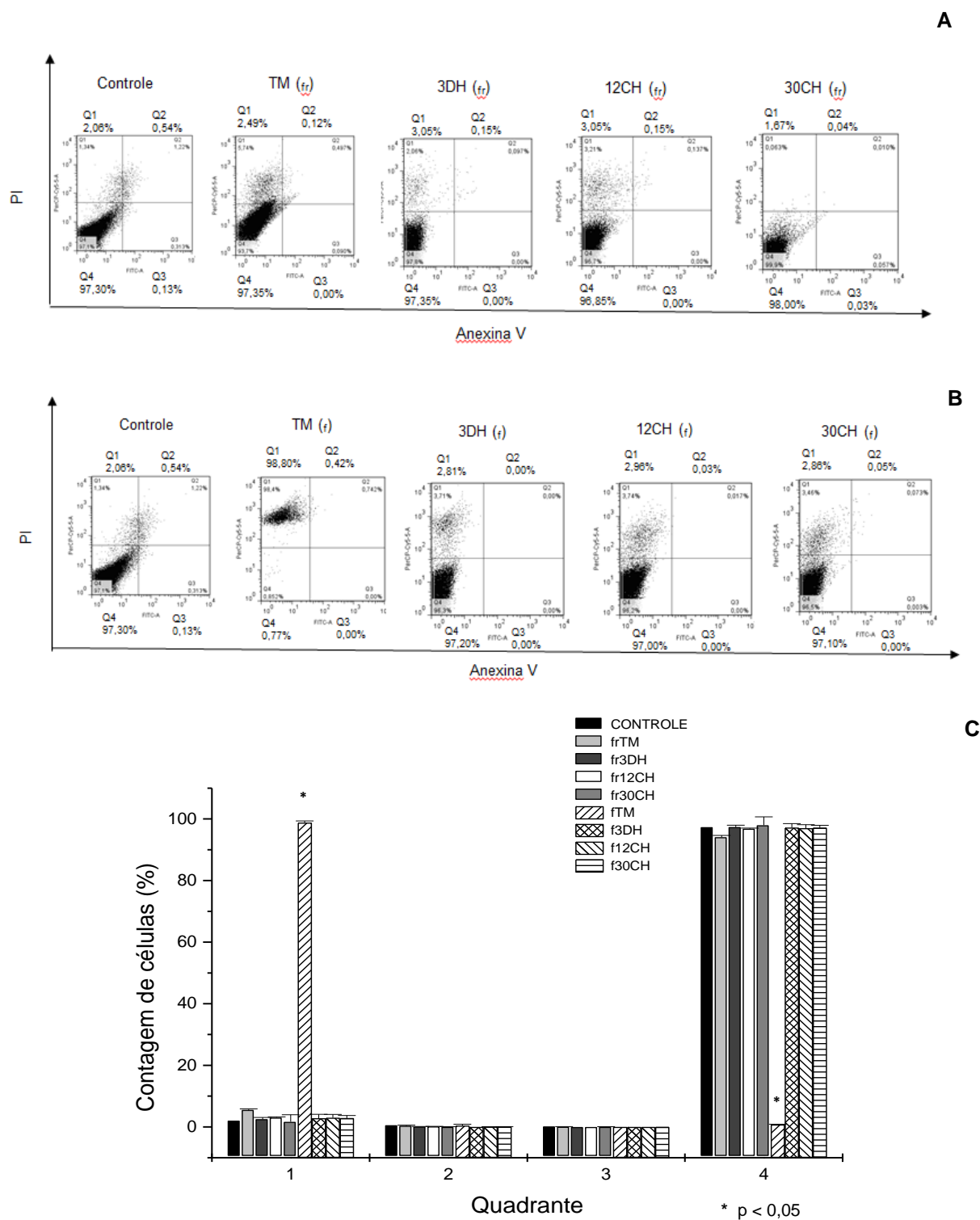


FIGURA 21 – Análise de citometria de fluxo de células PC-3 tratadas por 48 horas com produtos preparados a partir do extrato obtido por maceração; (A) Gráfico de pontos do controle, TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Gráfico de pontos do controle, TM (i), *M. charantia* (i) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Gráfico de barras representa a média \pm desvio padrão (n=2). Anexina-/PI- (Q4), células viáveis; Anexina+/PI- (Q3), células em apoptose; Anexina+/PI+ (Q2), células em estágio final de apoptose; Anexina-/PI+ (Q1), células em necrose.

Este FACS é representativo de dois ensaios independentes

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS HOMEOPÁTICOS DE *Momordica charantia* (fr) E (f) E SUAS RESPECTIVAS TM NO CICLO DAS CÉLULAS PC-3

Para determinar se o tratamento nas células PC-3 com produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) e suas respectivas TM alteravam a progressão do ciclo celular das células PC-3, a distribuição destas células nas diferentes fases do ciclo foi avaliada após as células serem expostas as amostras. *Blots* representativos são mostrados nas FIGURAS 22 A e B e os resultados de quantificação são fornecidos na FIGURA 22 C.

As análises do ciclo celular por citometria de fluxo mostraram que todas as amostras alteraram a distribuição das células fases do ciclo celular: G0-G1 e G2-M. Na primeira, os tratamentos promoveram uma diminuição do número de células nesta fase, por outro lado houve um aumento de células na fase G2-M, o que indicou que os tratamentos promovem uma parada celular nesta fase. A TM (f), além disto, provocou um aumento no número de fragmentos celulares (sub G1), o que, por conseguinte indica alta taxa de morte celular.

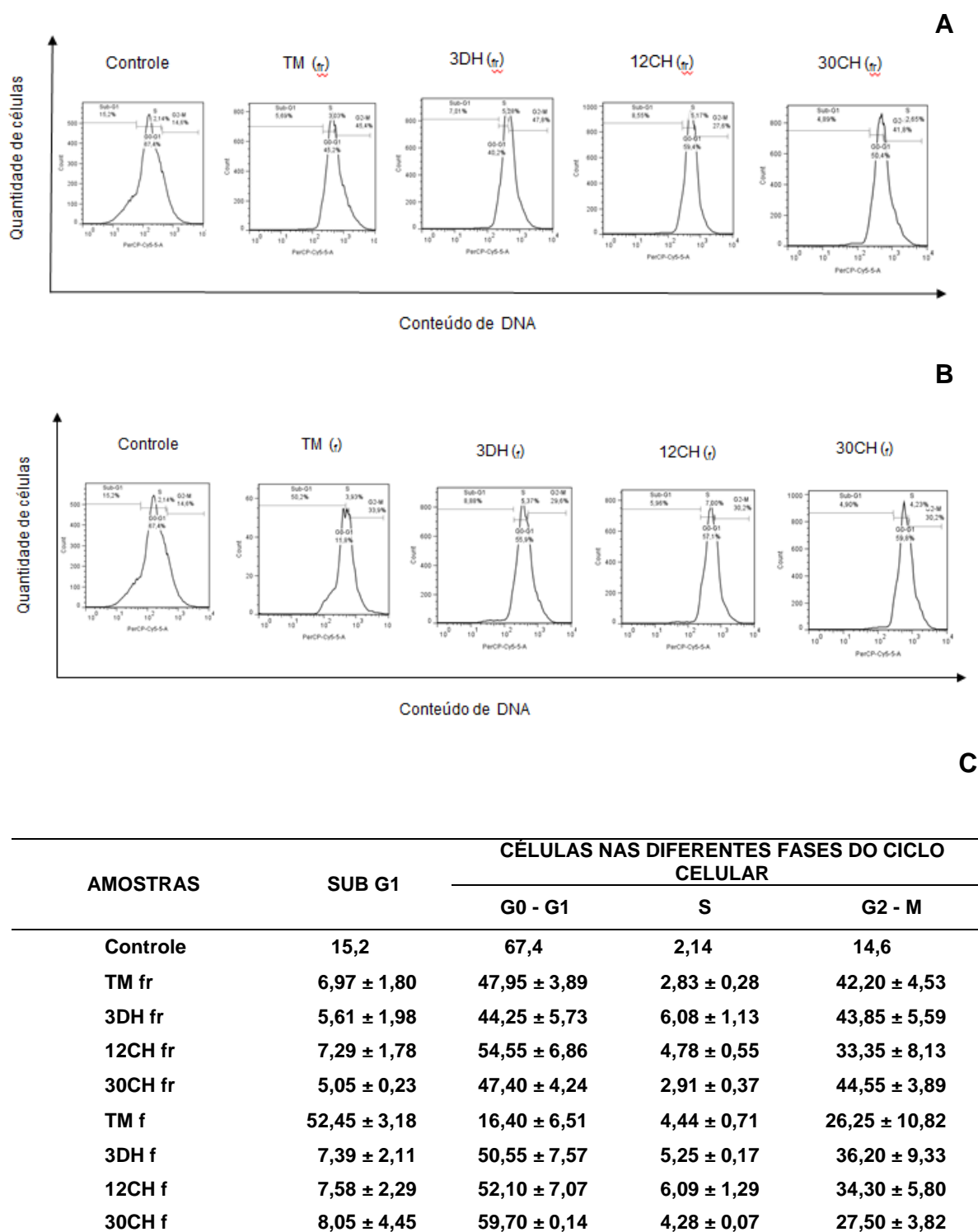


FIGURA 22 – Análise de ciclo celular de células PC-3 tratadas por 24 horas com produtos preparados a partir do extrato obtido por maceração; (A) Representação de *Dot plots* após análise no FlowJo de PC-3 tratada com TM (fr), *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) Representação de *Dot plots* após análise no FlowJo de PC-3 tratada com TM (f), *M. charantia* (f) 3DH, 12CH e 30CH; (C) Tabela sumarizada das médias dos valores obtidos em duas determinações ± desvio padrão (n=2).

Os dados levam a observação que TM (f) apresenta alta toxicidade para as células PC-3 induzindo morte celular, apoptose e principalmente necrose, além disso, provoca parada do ciclo celular na fase G1, o que, por conseguinte, também provoca morte celular. Pelo que se sabe, este é o primeiro trabalho que mostra um extrato (TM (f)) induzindo apoptose e necrose das células PC-3.

Foi verificado que o extrato aquoso de fruto de *M. charantia* provoca morte das células PC-3 por induzir parada do ciclo celular especificamente na fase S. Porém, não relata se este extrato induz apoptose ou necrose as células (RU et al., 2011).

Mais recentemente, Pitchakarn et al., (2012) também testaram o Kuj, bioativo isolado da folha da *M. charantia* por 24 e 48 horas para avaliar sua ação no ciclo celular de PC-3. Em ambos os tempos os resultados comparados com o controle mostraram maior número de células na fase G1 com diminuição nas fases S e G2-M, sugerindo inibição da proliferação celular de PC-3 induzida por Kuj associada com a parada de G1. Provavelmente, este composto deve estar presente na TM (f), o que também justificaria a inibição da proliferação celular de PC-3 em 48 horas observada nessa dissertação.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que tivessem avaliado alterações do ciclo celular de células PC-3 tratadas com medicamentos homeopáticos.

Como pode ser visto nos resultados encontrados nessa dissertação, todos os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) nas condições de 24 horas apresentaram alteração no ciclo celular de PC-3 levando aumento de sua proliferação.

A dinamização preconizada pela farmacotécnica homeopática, quando empregada para a produção das amostras de *M. charantia* (fr) e (f) lhes conferiu características semelhantes às encontradas nos medicamentos homeopáticos, isto é, manteve a ação farmacológica nas preparações ultradiluídas.

Poderia-se então considerar os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f) como medicamentos homeopáticos para uso nas prescrições clínicas pelos médicos? Ainda não se pode responder esta pergunta. Porém, não se deve esquecer de que os medicamentos homeopáticos agem no sistema imunológico promovendo sua ativação, embora ainda não esteja totalmente esclarecido este mecanismo de ação como relatam Bellavite et al., (2006).

Outro ponto importante sobre os medicamentos homeopáticos é que eles tratam os pacientes e não as doenças. Isto é, eles agem promovendo no indivíduo uma doença artificial maior que a natural, com sinais e sintomas semelhantes e desta forma restabelecendo o equilíbrio dos sistemas complexos afetados (fígado, rim, sistema imunológico entre outros) e deste modo retornando à homeostasia que foi rompida.

Portanto, para responder as indagações ainda existentes e permitir uma melhor compreensão destes dados aqui encontrados é necessário um maior número de experimentos para que os produtos de *M. charantia* sejam indicados como medicamentos homeopáticos.

5.8 MODELOS APLICÁVEIS AO CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS HOMEOPÁTICOS

No teste do MTT foram escolhidos os modelos com RAW264.7 e PC-3 tratados com amostra do (r_f) na condição experimental de 24 horas, representados respectivamente nas FIGURAS 23 (A) e (B) e 24 (A) e (B). Nos dois modelos seis eventos foram plotados e a linha de correlação linear apresenta inclinação descendente.

Os valores da regressão linear encontrados para o modelo com RAW264.7 foram na diluição (-0,98497) (FIGURA 23 A) e na dinamização (-0,98526) (FIGURA 23 B). Enquanto que para o modelo PC-3 foram encontrados na diluição (-0,91945) (FIGURA 24 A) e na dinamização (-0,92714) (FIGURA 24 B). Comparando os valores de um mesmo modelo entre si (RAW264.7 e PC-3), a diluição e a dinamização apresentaram correlação semelhante, mas no teste de MTT o modelo com RAW264.7 mostrou melhor linearidade.

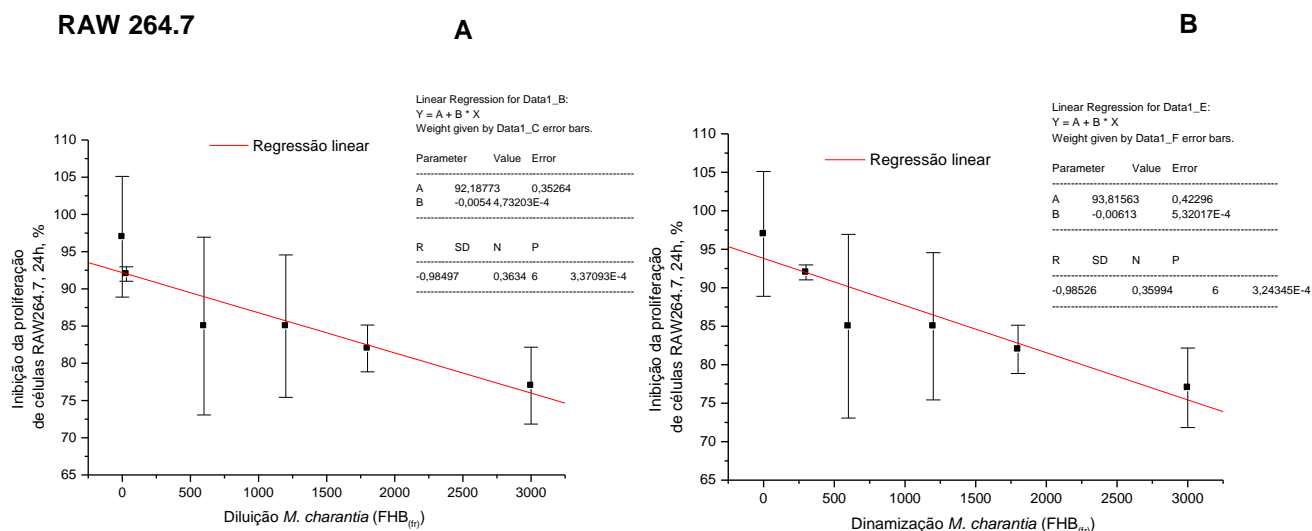


FIGURA 23 - Curva de regressão linear de TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e dos produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH, 30CH;
 (A) Percentual de inibição da proliferação de Células RAW 264.7 após 24 h pela diluição;
 (B) Percentual de inibição da proliferação de Células RAW 264.7 após 24 h pela dinamização.

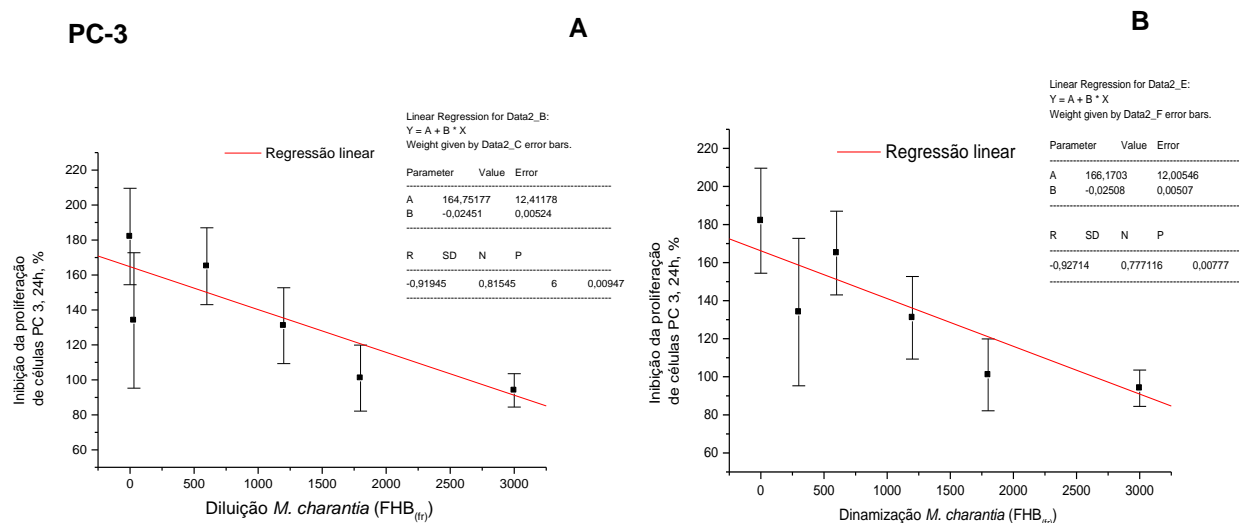


FIGURA 24 - Curva de regressão linear de TM (fr) preparada a partir do extrato obtido por maceração e dos produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 6CH, 12CH, 18CH, 30CH;
 (A) Percentual de inibição da proliferação de Células PC-3 após 24 h pela diluição;
 (B) Percentual de inibição da proliferação de Células PC-3 após 24 h pela dinamização.

Dentre os testes de avaliação da atividade imunológica foram escolhidos os de produção de NO por RAW264.7 tratadas com amostras do (fr) ativadas com LPS FIGURA 25

Na FIGURA 25 (A) e (B) podem-se observar os valores na diluição, sendo em (A) com todas as amostras (+0,88561) e em (B) somente com os produtos dinamizados (+0,99987). Já em (C) e (D) vê-se os valores na dinamização, sendo (C) com todas as amostras (+0,91356) e (D) somente os produtos dinamizados (+0,99190).

Plotando somente os valores das amostras dinamizadas melhora a linearidade com maior coeficiente de regressão linear.

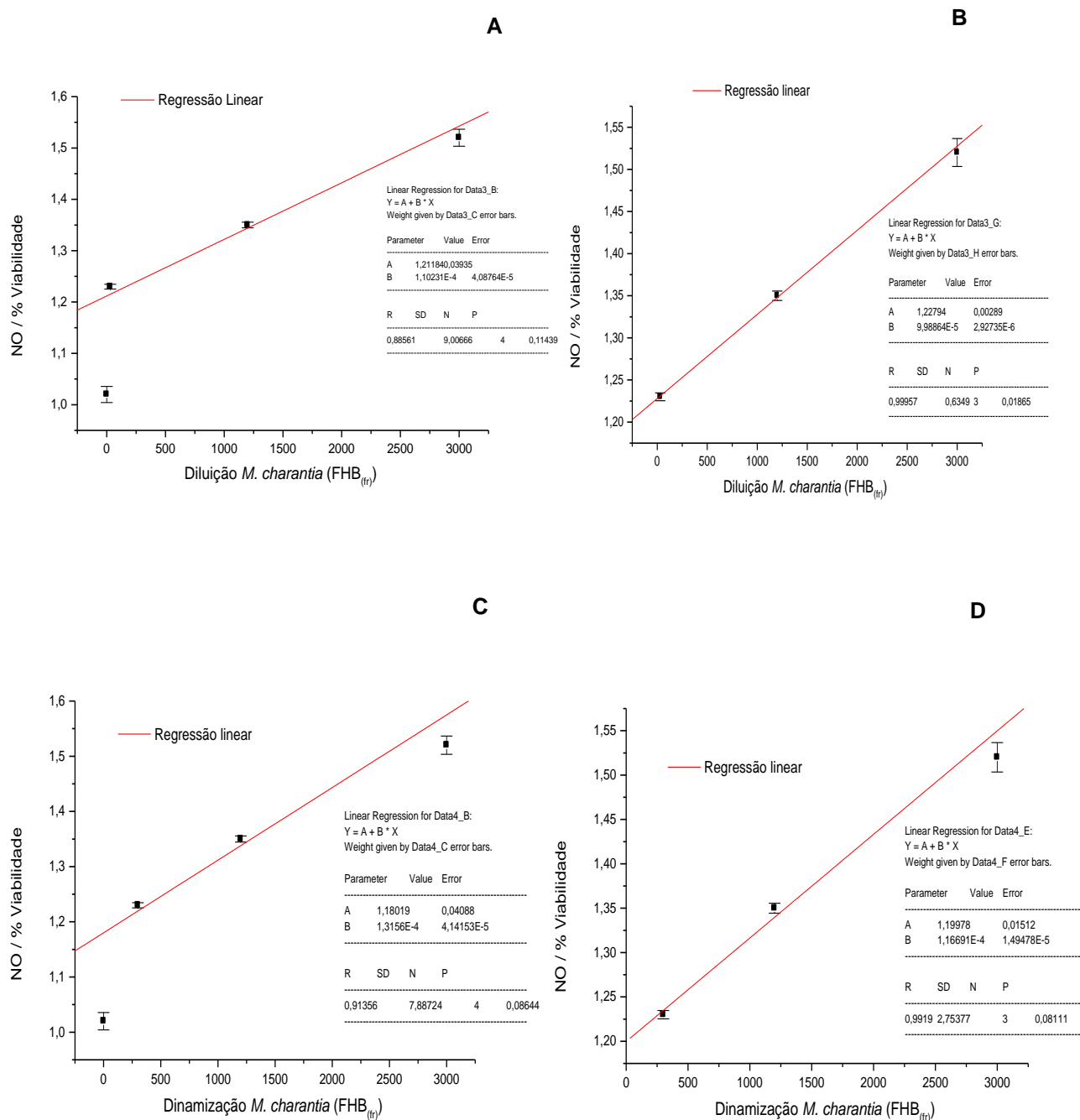


FIGURA 25 - Curva de regressão linear razão da liberação de NO por células RAW 264.7 com LPS tratadas após 24 h.

Pela diluição (A) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH.

Pela dinamização (C) TM (fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (D) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH.

Para o teste de produção de NO por RAW264.7 tratada com amostras do (fr) sem LPS os valores encontrados estão apresentados na FIGURA 26, sendo (A) e (B) os valores na diluição. (A) com todas as amostras (+0,83756) e em (B) somente com os produtos dinamizados (+0,99999), enquanto em (C) e (D) vê-se e na dinamização, (C) com todas as amostras (+0,67646) e (D) somente os produtos dinamizados (+0,99814).

Da mesma forma também se observa que plotando somente os valores das amostras dinamizadas melhora a linearidade com maior coeficiente de regressão linear.

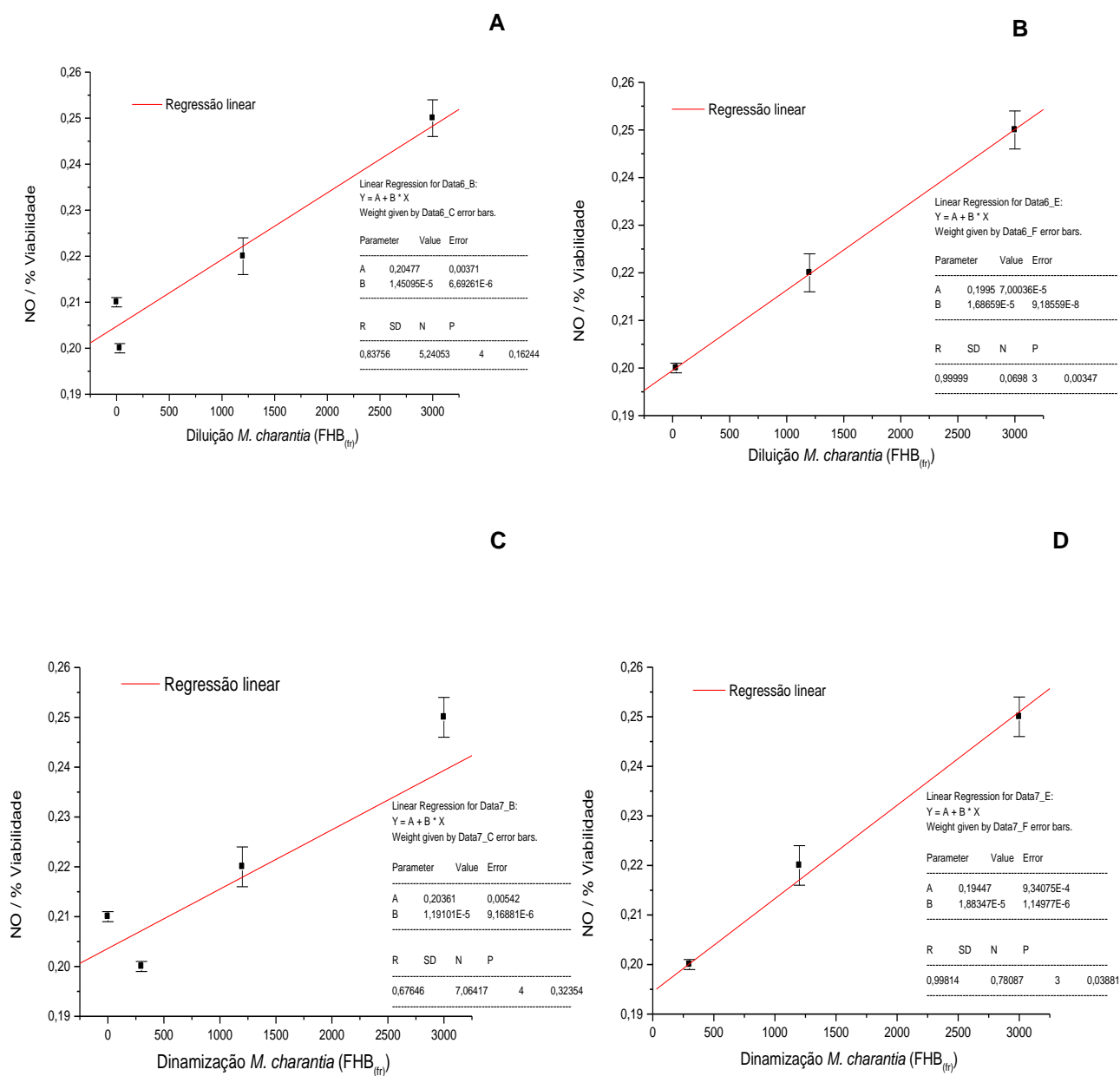


FIGURA 26 - Curva de regressão linear razão da liberação de NO por células RAW 264.7 sem LPS tratadas após 24 h. Pela diluição (A) TM_(fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (B) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH. Pela dinamização (C) TM_(fr) preparadas a partir do extrato obtido por maceração e produtos de *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH; (D) *M. charantia* (fr) 3DH, 12CH e 30CH.

Para Ribani et al., (2004) a linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve conter todos os pontos a serem usados, estando estes dentro do intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame.

Quando se avalia um fenômeno biológico considera-o representativo, quanto melhor for a representação da regressão linear, que consiste em utilizar o maior número de eventos e ter o resultado mais próximo ao número um (JHANG et al. 2004).

Os testes de avaliação da produção de TNF- α e de IL6, embora tenham apresentados resultados relevantes quanto à ação dos produtos dinamizados, não foram selecionados por terem apresentado um valor de coeficiente de regressão linear muito distante de 1 (um).

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, uma correlação linear não “dose dependente”, mas, um efeito linear “**dinamização dependente**”. O ineditismo deste efeito poderá ser aplicado junto ao controle de qualidade e ao processo de obtenção de produtos homeopáticos, que por sua própria natureza, são altamente diluídos e dinamizados e que são impossíveis de se avaliar pelos métodos físico-químicos usuais ao controle de qualidade.

6 CONCLUSÃO

As TM apresentaram efeito citotóxico frente às células RAW 264.7. Além disso, TM (f) foi muito mais potente do que TM (fr) como imunomodulador e como agente citotóxico contra células tumorais, sendo capaz de induzir apoptose e necrose das células.

Nem todas as amostras dinamizadas apresentaram efeitos citotóxicos nem imunomoduladores. E aquelas que apresentaram, perderam sua ação com passar do tempo.

Todas as amostras dinamizadas foram incapazes de estimular a liberação de NO, TNF- α e IL-6. Contudo, elas apresentaram um efeito sinérgico com LPS, estimulando a liberação destes mediadores da inflamação acima dos valores observados apenas com LPS. Destacou-se a amostra 30 CH que foi a mais efetiva em estimular a liberação desses mediadores, exceto no caso do TNF- α . Nesta situação, 12 CH foi a mais efetiva.

Dos produtos homeopáticos de *M. charantia* os obtidos da folha foram mais citotóxicos que os de fruto. O tempo de 48 horas foi a melhor condição experimental, pois se observou efeito citotóxico para a maioria das linhagens incubadas com os produtos homeopáticos *M. charantia*. (fr) e (f) e a célula PC-3 foi a mais sensível aos produtos.

As análises do ciclo celular levaram a conclusão que todos os produtos homeopáticos de *M. charantia* (fr) e (f), alteraram a distribuição das células fases do ciclo celular: G0-G1 e G2-M. Os tratamentos promoveram uma diminuição do número de células na fase G0-G1, por outro lado houve um aumento de células na fase G2-M, indicando que os tratamentos promovem uma parada celular nesta fase. A TM (f), além disto, provocou um aumento no número de fragmentos celulares (sub G1), o que, por conseguinte indica alta taxa de morte celular.

Este estudo permitiu a seleção de modelos aplicáveis ao controle de qualidade dos produtos homeopáticos tendo como parâmetro de avaliação, um novo paradigma: De efeito “dose dependente”, para um efeito “**dinamização dependente**”. Através dos modelos que foram aplicados aos produtos homeopáticos de *M. charantia*, ou seja, o teste do MTT para avaliar citotoxicidade em células RAW 264.7 e em PC-3 na condição de 24 horas e a dosagem da produção de NO por

Conclusão

células RAW264.7 com e sem LPS que apresentaram boa linearidade com coeficiente de regressão linear próximo a um.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, S. A. C. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal** [S.l.], v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.

BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health and Systemic Pharmacology**, [S.l.], v. 65, p. 356-359, 2003.

BELLAVITE, P. et al. Immunology and homeopathy. 2. Cells of immune system and inflammation. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 13-24, 2006.

BELLAVITE, P.; ORTOLANI, R.; CONFORTI, A. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 171-186, 2006.

BILDET. J. et al. Action in vitro de dilutions infinitesimales de Phytolacca Americana sur la transformation lymphoblastique ala phytohemagglutinine. **Ann. Home´opath Fr.**, [S.l.], v. 23, p.102-111, 1981.

BOIRON J. et al. L'e´tude de l'action de dilutions hannemanniennes de chlorure mercurique sur l'index mitotique de cultures de cellules animals. **Ann Home´opath Fr.**, [S.l.], v. 23, p. 43-49, 1981.

BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**, [S.l.], v. 99, p. 37-50, 2010.

BONAMIN, L. V. et al. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo. **Br Homeopathy J.**, [S.l.], v. 90, p. 198–203, 2001.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução nº 1000, de 21 de julho de 1980. Dispõe sobre o reconhecimento pelo Conselho Federal de Medicina da especialidade de hoemopatia. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1980 Seção I, Parte II.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**, Brasília, p.92, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 33, de 19 de abril de 2000. Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos em Farmácia. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 jun.2001. Seção 1, p.74.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 67 de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 agosto 2006. Seção 1, p.71.

BROWN, V.; ENNIS, M. Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations. **Inflamm. Res.**, [S.l.], v. 50, iss. 2, p. 47-48, 2001.

CARILLO JÚNIOR, R. **Homeopatia interna e terapêutica**. São Paulo: Santos, 2000.

CARILLO JÚNIOR, R. **O milagre da imperfeição: vida, saúde e doença numa visão sistêmica**. São Paulo: Pensamento Cultrix, 2008.

CHIRILA, M. et al. The in vitro action of a succussed substance on the proliferative response of human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. **Rom. J. Intern. Med.**, [S.l.], v. 30, p. 63-67, 1992.

CHIRUMBOLO, S. et al. Effects of homeopathic preparations of organic acids and of minerals on the oxidative metabolism of human neutrophils. A controlled trial. **Br. Homeopath. J.**, [S.l.], v. 82, p. 227-244, 1993.

CHIRUMBOLO, S. et al. Effects of Podophyllum peltatum compounds in various preparations dilutions on human neutrophil functions in vitro. **Br. Homeopath. J.**, [S.l.], v. 86, p. 16-26, 1997.

COLAS, H. et al. Inhibition du test de transformation lymphoblastique (TTL) ala phytohemagglutinine (PHA) par *Phytolacca americana* en dilution homeopathiques. **Ann Homeopath Fr.**, [S.l.], v. 6, p. 1-11, 1975.

CONFORTI, A. et al. Experimental studies on the anti-inflammatory activity of a homeopathic preparation. **Biol. Ther.**, [S.l.], v. 15, p. 28-30, 1997.

DELLMOUR, F. Medicamentos homeopáticos: como podemos garantir substâncias em estado bruto confiáveis de acordo com a matéria médica? In: CONGRESSO DA LIGA

MÉDICA HOMEOPÁTICA INTERNACIONAL, 53., 1998, Amsterdam. Anais..., Amsterdam, 1998.

DE LIMA, T. M. Citometria de fluxo. In: PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 32.

DE OLIVEIRA, C. C et al. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, [S.l.], v. 52, p.420-432.

DE OLIVEIRA, S. M. et al. Mercurius solubilis: actions on macrophages. **Homeopathy**, [S.l.], v.100, p. 228-236, 2011.

DIEHL, E. E.; SONAGLIO, D.; LIMA, N. F.; BACKES, S. Estudo dos fatores impregnação e secagem nas características de glóbulos utilizados em homeopatia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 143-150, 2008.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 10, n. 2A, p. 488-500, abr/jun. 2009.

ENNIS, M. Basophil models of homeopathy: a sceptical view. **Homeopathy**, [S.l.], v.99, p. 51-56, 2010.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 3 ed. [S.L.:s.n.]. 2010. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 01 out. 2011.

FIMIANI, V.; CAVALLARO, A.; AINIS, O.; BOTTARI, C. Immunomodulatory effect of the homoeopathic drug Engystol-N on some activities of isolated human leukocytes and in whole blood. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, [S.l.], v. 22, p. 103-115, 2000.

FLETCHER, M. P.; HALPERN, G. M. Effects of dilutions of Bryonia (4-9CH) and lung-histamine (4-9CH) on human neutrophil (PMN) activation responses as assessed by flow cytometry. In: PROCEEDINGS OF THE 2ND GIRI MEETING, 17., 1988, Monte Carlo. Anais, Monte Carlo, 1988, p. A20

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 2008. 86 f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J Ethnopharmacol.**, [S.l.], v. 93, p. 123-132, 2004.

GUPTA, S. et al. Momordicatin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. **Parasitology International**, [S.l.], v. 59, p. 192–197, 2010.

HAHNEMANN, S. **Organon**: da arte de curar. São Paulo: Homeopatia hoje, 1994.

IVE, E. C.; COUCHMAN, I. M. S. ; REDDY, L. Therapeutic Effect of *Arsenicum album* on Leukocytes. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 13, p. 3979-3987, 2012.

JAGGI, R. et al. Dual inhibition of 5-ipoxygenase/cyclooxygenase by a reconstituted homeopathic remedy; possible explanation for clinical efficacy and favourable gastrointestinal tolerability. **Inflamm. Res.**, [S.l.], v. 53, p.150-157, 2004.

JHANG, J. S. et al. Evaluation of Linearity in the Clinical Laboratory. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, [S.l.], v. 128, p. 44-48, 2004.

JIRATCHARIYAKUL, W. et al. HIV inhibitor from Thai bitter gourd. **Planta Medica**, [S.l.], v. 67, p. 350-353, 2001.

KOBORI, M. et al. Bitter Gourd Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v.56, p. 4004-4011, 2008.

LAGARTO, A. et al. Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. **Rev Cubana Plant. Med.**, [S.l.], v.13, n. 3, p. 1-9, 2008.

LII, C. K. et al. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 122, p. 227-233, 2009.

LIMA, J. A. et al. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **J. Appl. Toxicol.**, [S.l.], v. 30, p 708-715, 2010.

- LIMA, V. et al. Main inflammatory mediators involved in the physiopathology of periodontitis – role of pharmacological modulators. **R. Periodontia.**, [S.l.], v.18, n.3, p. 7-9, 2008.
- LIMTRAKUL, P.; KHANTAMAT, O.; PINTHA, K. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, [S.l.], v.54, p. 525-530, 2004.
- LENZI, M.; ORTH, A. I.; GUERRA, T.; M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 505-313, 2005.
- LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no final do século XX. **Rev. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 13-43, 1997.
- LUSSIGNOLI, S. et al. Effect of Traumeel S, a homeopathic formulation, on blood-induced inflammation in rats. **Complement. Ther. Med.**, [S.l.], v. 7, p. 225-230, 1999.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.; C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACLAUGHLIN, B.W. et al. Effects of homeopathic preparations on human prostate cancer growth in cellular and animal models. **Integr. Cancer Ther.**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 362-372, 2006.
- MAIA, R. M. et al Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 489-493, 2010.
- MANDUCA, P. et al. FMS-Calciumfluor specifically increases mRNA levels and induces signaling via MAPK 42,44 and not FAK in differentiating rat osteoblasts. **Cell. Biol. Int.**, [S.l.], v. 29, p. 629-637. 2005.
- MATOS, D. C. **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas**. 2008. 116 f Dissertação (Mestrado Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 4 ed. Ceará: UFC, 2002.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, [S.l.], v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S.l.], v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSS, V. A.; ROBERTS, J. A.; SIMPSON, H. K. L. The action of 'low potency' homeopathic remedies on the movement of guinea pig macrophages human leukocytes. **Br. Homeopath J.**, [S.l.], v. 71, p. 48-61, 1982.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NERURKAR, P.; RAY, R. B. Bitter melon: antagonist to cancer. **Pharm Res.**, [S.l.], v. 27, p. 1049-1053, 2010.

NERURKAR, P. et al. Momordica charantia (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, [S.l.], v. 8, n. 64, p. 1-19, 2011.

NG, T. B.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. **General Pharmacology**, [S.l.], v. 23; p. 579-590, 1992.

PALERMO, C. et al. Osteogenesis in vitro in rat tibia-derived osteoblasts is promoted by the homeopathic preparation, FMS-Calciumfluor. **Cell. Biol. Int.**, [S.l.], v. 23, p.31-40, 1999.

PEC, M. K. et al. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochem. Pharmacol.**, [S.l.], v. 65, p. 1451–1461, 2003.

PITCHAKARN, P. et al. Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf, modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line, PC3. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 50, p. 840-847, 2012.

POITEVIN, B.; AUBIN, M.; BENVENISTE, J. Effect d'Apis Mellifica sur la dégranulation des basophiles humains in vitro. **Homeopathie Franc.**, [S.l.], v. 73, p. 193-198, 1985.

POITEVIN, B.; AUBIN, M.; BENVENISTE, J. Approche d'une analyse quantitative de l'effet d'apis mellifica sur la dégranulation des basophiles humains in vitro. **Innov. Tech. Biol. Med.**, [S.l.], v. 7, p. 64-68, 1986.

POITEVIN, B.; AUBIN, M.; ROYER, J. F. Effet de belladonna et ferrum phosphoricum sur la chemiluminescence des polynucleaires neutrophiles humains. **Ann. Homeopath Fr.**, [S.l.], v.3, p. 5-12, 1983.

POROZOV, S. et al. Inhibition of IL-1beta and TNF-alpha secretion from resting and activated human immunocytes by the homeopathic medication Traumeel S. **Clin Dev Immunol.** [S.l.], v. 11, p. 143-149, 2004.

PUTNAM, C. D.; TAINER, J. A. The food of sweet and bitter fancy. **Natural and Structural Biology**, [S.l.], v. 7, p. 17- 18, 2000.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, [S.l.], v. 2, p. 349-362, 1996

RAMOS, L. A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quim. Nova**, [S.l.], v.29, n 3, p.1114- 1120, 2006.

RAY, R. B. et al. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Res**, [S.l.], v. 70, p. 1925-1931, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RU, P. et al. Bitter melon extract impairs prostate cancer cell cycle progression and delays prostatic intraepithelial neoplasia in TRAMP model. **Cancer Prev Res (Phila.)**, [S.l.], v. 4, n. 12, p. 2122-2130, 2011.

SATO, D. Y.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, [S.l.], v. 94, p. 26-32, 2005.

SELIGMANN, I. C.; LIMA, P. D.; CARDOSO, P. C.; KHAYAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BUCHI DDE, F. et al. The anticancer homeopathic composite 'Canova Method' is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genet Mol Res**, [S.l.], v. 2, p. 223-228, 2003.

SIQUEIRA, C. M. et al. H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. **Homeopathy**, [S.l.], v.102, p. 31-40, 2013.

SOUNDARARAJAN, R.; PRABHA P.; RAI U.; DIXIT A. Antileukemic Potential of Momordica charantia Seed Extracts on Human Myeloid Leukemic HL60 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** doi:10.1155/2012/732404, 2012.

SUNILA, E. S. et al. Dynamized preparations in cell culture. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 257-263, 2009.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev Med**, São Paulo, v. 85, n. 2, p. 30-43, 2006.

THANGAPAZHAM, R. L. et al. Homeopathic medicines do not alter growth and gene expression in prostate and breast cancer cells in vitro. **Integr. Cancer Ther.**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 365-361, 2006.

THE HOMEOPATHIC PHARMACOPOEIA OF THE UNITED STATES (HPUS). 9. ed. Boston: American Institute of Homeopathy, 1999.

VAN MANSVELT, J. D.; AMONS, E. Inquiry into the limits of biological effects of chemical compounds in tissue culture. I. Low dose effects of mercure chloride. **Z. Naturforsch.**, [S.l.], v. 30, p. 643-649, 1975.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, [S.l.], v.53, n. 3, p. 537-549, 2008.

WANG, H. X.; NG, T. B. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. **Planta Medica**, [S.l.], v. 67, p. 669-672, 2001