

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Daniela Franco Lopes

**UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA NA VERIFICAÇÃO DA
CITOTOXIDADE DO *Viscum album* EM CÉLULAS CACO-2 IN VITRO**

São José dos Campos, SP
2008

Daniela Franco Lopes

**UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA NA VERIFICAÇÃO DA
CITOTOXIDADE DO *Viscum album* EM CÉLULAS CAC0-2 IN VITRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof.Dr.Marcos Tadeu.T. Pacheco
Profa.Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP
2008

L851u

Lopes, Daniela Franco

Utilização da Espectroscopia Raman Dispersiva na verificação da citotoxicidade do *Viscum album* em células Caco-2 in vitro / Daniela Franco Lopes; Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares. São José dos Campos, 2008.

1 Disco laser: Color

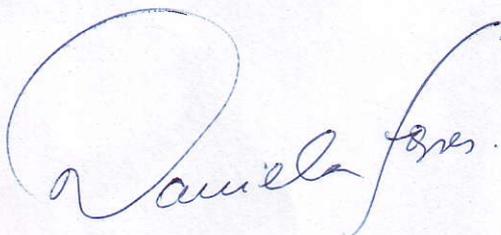
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1 Homeopatia 2. Técnicas de Cultura de Células 3. Neoplasias 4. Análise Espectral Raman I. Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Orient., II. Soares, Cristina Pacheco, co-orient. III. Título.

CDU: 615.015.32

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data da defesa: 25 de abril de 2008.

DANIELA FRANCO LOPES

**“UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA NA VERIFICAÇÃO
DA CITOTOXIDADE DO *Viscum album* EM CÉLULAS CACO-2 IN VITRO”**

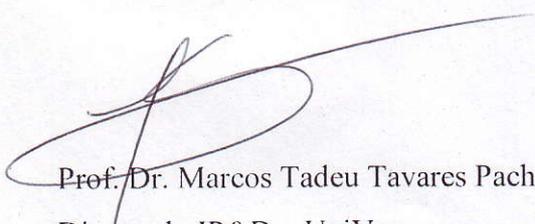
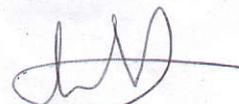
Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **MARCOS TADEU T. PACHECO** (UNIVAP) _____

Prof^ª. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) _____

Prof^ª. Dra. **LEONI VILANO BONAMIN** (UNIP) _____



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 25 de abril de 2008.

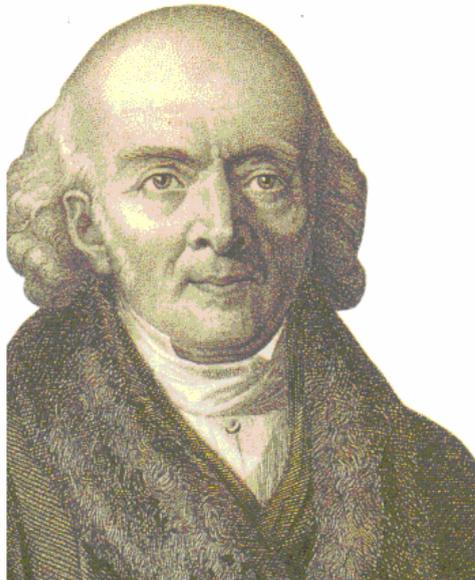
Dedico a meus pais José Paulo e Iracema e meu irmão Daniel pelo apoio moral e financeiro em tudo que me propuz fazer intelectualmente;

A meus amigos e patrocinadores Marcelo e Alice representantes da empresa Homeocenter/Injectcenter e a todos os funcionários envolvidos neste propósito em prol da Pesquisa Homeopática no Brasil;

A meu amigo e colega Dr. Aloísio Cunha de Carvalho, meu eterno mestre na arte de curar através da Homeopatia;

Ao Dr. Izaio Carneiro Soares, representante oficial do Instituto François Lamasson e a todos os funcionários e professores que contribuíram para minha formação de Homeopata, dedico e ofereço minhas reverencias por mais esta conquista.

Dedico *In memoriam* a Hahnemann, Allan Kardec, Dr. Bezerra de Menezes e Chico Xavier pelo apoio a Homeopatia.



Samuel Hahneman (Servais, 2006)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* e ao plano *maior* por mais uma missão executada com muito sacrifício, porem muito proveitoso...

Agradeço ao meu orientador Prof.Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, ao meu orientador extra-oficial Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr. que se dedicou além de seus limites possíveis, ao meu colega Jamil Saade e a todos os funcionários envolvidos.

Agradeço a vocês meus ``desorientadores`` pelos desvios e dificuldades, por cada pedra lançada na estrada , saibam que até tropecei , cai e me feri, mas guardei em minha bagagem cada uma delas e as usei para construir os degraus que hoje estou, o meu muito obrigado!!!

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA NA VERIFICAÇÃO DA CITOTOXIDADE DO *Viscum album* EM CÉLULAS CACO-2 ``IN VITRO``

RESUMO

Foi observado nas últimas décadas um aumento gradual nos diagnósticos de neoplasias nos seres humanos e nos animais. Isto pode ser atribuído tanto às pesquisas, como aos avanços da tecnologia, que propiciaram maior facilidade para os diagnósticos, promovendo um aumento da longevidade. A atual incidência de casos de câncer deve-se, também, ao uso exagerado da química nos alimentos, às radiações maléficas das antenas, aos poluentes ambientais e ao uso indiscriminado de hormônios contraceptivos, além de alterações genéticas. A oncologia clínica, tradicionalmente, utiliza Quimioterápicos no tratamento de tumores. Posteriormente, foram introduzidos os antineoplásicos imunomoduladores, da classe vegetal a qual pertence o *Viscum album*. No presente estudo foi verificada a eficiência do extrato do *Viscum album* injetável nas concentrações D3 (0.1 µg/mL), D6 (0.1 ng/mL), D9 (0.1X10⁻³ ng/mL), D12 (0.1X10⁻⁶ ng/mL) e D30 (0.1X10⁻²⁴ ng/mL) em células Caco-2 *in vitro*. Utilizou-se o método óptico através da Espectroscopia Raman Dispersiva a 830nm, comparando-se com o ensaio do Teste de MTT Assay. Os resultados dos ensaios demonstraram que o *Viscum album* atua na atividade mitocondrial reduzindo a viabilidade celular nas células Caco-2, nas concentrações *Viscum album* D3, D6 e D9. A correlação do espectro Raman foi analisada pelo método estatístico de PLS, com os valores do teste de MTT e mostrou-se uma ferramenta bastante sensível para a detecção das mudanças na atividade mitocondrial das células Caco-2. O método diagnóstico por Espectroscopia Raman é um procedimento não invasivo, assim, o diagnóstico é obtido em tempo real, possibilitando redução de custos, além de indicar a melhor terapia para cada tipo de tumor e permitir mudanças estratégicas durante o tratamento.

Palavras-chave: Homeopatia Injetável, Cultura células, Neoplasia, MTT Assay, Espectroscopia Raman Dispersiva.

USE OF DISPERSIVE RAMAN SPECTROSCOPY TO VERIFY THE CYTOTOXIC ACTION OF *VISCUM ALBUM* IN CACO-2 CELLS `IN VITRUM`

ABSTRACT

It was observed in them you finish decades a gradual increase in the diagnostic of neoplasm in the human beings and the animals. This can in such a way be attributed to the research, as to the advances of the technology, that had propitiated greater easiness for the diagnostic, promoting an increase of the longevity. The current incidence of cancer cases must, also, to the exaggerated use of chemistry in foods, to the maleficent radiations of the antennas, to the ambient pollutants and the indiscriminate contraceptive hormone use, beyond genetic alterations. The clinical oncology, traditionally, uses Chemotherapics in the treatment of tumors. Later, the Immodulates Chemotherapics been introduced, of the vegetal classroom which belongs to the *Viscum album*. In the present study *Viscum album* in the concentrations D3 (0,1µg/mL), (D6 (0,1 ng/mL), D9 (0.1X10⁻³ ng/mL), D12 (0.1X10⁻⁶ ng/mL) and D30 (0.1X10⁻²⁴ ng/mL) was verified the efficiency of the extract injectable in Caco-2 cells *in vitro*. The optic method through the Dispersive Raman Spectroscopy at 830nm, comparing itself with the assay of the Test of MTT Assay. The results of the assays had demonstrated that the *Viscum album* acts in the mitochondrial activity reducing the cellular viability in the Caco-2 cells, in the *Viscum album* concentrations D3, D6 and D9. The correlation of the Raman spectrum was analysed by the statistical method of PLS, with the values of the MTT test and revealed a sufficiently sensible tool for the detention of the changes in the mitochondrial activity of the Caco-2 cells. The diagnostic method for Raman Spectroscopy is a not invasive procedure, thus, the diagnosis is gotten in real time, making possible reduction of costs, beyond indicating the best therapy for each type of tumor and allowing strategical changes during the treatment.

Keywords: Injectable Homeopathic Medicine, Neoplasm, Colon, cell Culture, MTT Assay, Dispersive Raman Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental (PERERA, 1997).	25
Figura 2: Diagrama esquemático da Espectroscopia Raman Dispersiva a 830nm potencia de 80mw do laser e escala espectral de 800 a 1800 cm ⁻¹ . Fonte: (SATHAIAH, 1996).....	34
Figura 3: Cubeta de quartzo no porta amostra	34
Figura 4: Espectro Raman da diluição D3 (0.1 µg/mL) com células caco-2.....	38
Figura 5: Picos Raman da Célula Caco-2 (Azul) e Solução Fisiol. 0,9% (vermelho).....	39
Figura 6: Picos da cubeta se repetem em ambas as diluições e que a faixa de 1200 a 1400 cm ⁻¹ caracteriza a presença das células Caco-2.....	40
Figura 7: Gráfico dos primeiros dois espectros com as duas variáveis latentes do modelo de PLS, mostrando características espectrais principais.	41
Figura 8: Teste MTT Assay, onde a viabilidade celular foi medida pela densidade óptica, demonstra que a ação dos VA D3 (0.1 µg/mL D9 (0.1X10 ⁻³ ng/mL) e foram os que atuaram melhor na diminuição da viabilidade celular comparando com o (VIN) Sulfato de Vincristina a 0,01µg/mL.....	42
Figura 9: Análise estatística correlacionando % Viabilidade celular com primeira variável latente	42
Figura 10: Análise estatística correlacionando a % Viabilidade celular com as 2 principais variáveis.....	43
Figura 11: Gráfico de MTT Assay comparado ao PLS calculando Espectro Raman usando a segunda variável latente.....	43
Figura 12: A- células Caco-2; B-células caco-2 e VA D3; C-células Caco-2 e VA D6; D- células Caco-2 e VAD9; E-células Caco-2 e VA D12; F- células Caco-2 e VA D30.	44
Figura 14: Serie de Diluições da Centesimal Hahnemaniana (CH), de acordo com a Farmacopéia Homeopática Alemã e Francesa	64
Figura 15: Dinamizador de Fluxo Contínuo.....	65
Figura 16: Ampolas Estéreis de Homeopáticos (Injectcenter).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

E.R. D.....	Espectroscopia Raman Dispersiva
VA.....	<i>Viscum album</i>
VA D3.....	concentração 0.1µg/mL
VA D6.....	concentração 0.1ng/mL
VA D9.....	0.1X10 ⁻³ ng/mL
VA D12.....	0.1X10 ⁻⁶ ng/mL
VA D30.....	0.1X10 ⁻²⁴ ng/mL
VL1.....	1 ^a variavel latente
VL2.....	2 ^a variavel latente
MTT Assay.....	Metil tetrazolato
PLS.....	Regressão por quadrados mínimos parciais (Partral Least Square)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Espectroscopia Raman	17
2.2	Origem do <i>Viscum album</i>	20
2.3	Antroposofia e Homeopatia injetável	20
2.4	Experimentações com <i>Viscum album</i>	21
2.5	Uma visão do Câncer.....	24
2.6	Terapias antineoplásicas	27
3	MATERIAL E METODOS	29
3.1	Cultura Celular.....	29
3.2	Aquisição das imagens das células	30
3.3	Características Farmacológicas	30
3.4	Cultura celular para Espectroscopia Raman.....	31
3.5	Cultura Celular para MTT:.....	32
3.6	Sistema de Espectroscopia Raman Dispersivo	32
3.6	Processamento dos Espectros	35
3.7	Análise Estatística Multivariada.....	35
4	RESULTADOS	38
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	49
6.1	ESTUDOS FUTUROS.....	49
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A	59
	1) Fundamentos da Homeopatia.....	59
	2) A Homeopatia no Brasil.....	62
	3) Farmacologia Homeopática	63
	ANEXO B: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	67

1 INTRODUÇÃO

A Espectroscopia é o estudo do espectro obtido pela interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. Nesta técnica utiliza-se a radiação eletromagnética para testar o comportamento vibracional de moléculas, observando-se a absorção ou espalhamento dessa radiação (SALA, 1996).

Embora o efeito Raman tenha sido utilizado pela primeira vez há mais de 70 anos, a Espectroscopia Raman não era empregada como instrumento de análise até a invenção do Laser (HANLON; MANOHARAM, 2000). Desde então a Espectroscopia Raman se tornou uma ferramenta potencialmente importante na análise química na área de saúde. Atualmente, já permite o estudo de patologias humanas in vitro através da detecção qualitativa e quantitativa de componentes bioquímicos em sangue, urina, tecidos biológicos e fluidos corporais (MANOHARAM et al, 1998).

A oncologia é uma das especialidades mais desafiadoras da atualidade, seja tratando-se de seres humanos ou de animais. Estudos recentes revelam que o Adenocarcinoma de Colon (Caco-2) ocupa o 3º lugar em ocorrências no gênero masculino e o 4º no feminino, sendo uma das 5 primeiras causas de mortes no Brasil (CASTRO; COELHO, 2004). A sua ocorrência em animais é rara.

O entendimento da etiologia genética do câncer contribuiu muito para a elaboração de novas terapias. Algumas são efetivas, conseguindo erradicar o câncer, outras apenas controlam de maneira pouco eficiente. Os tratamentos convencionais baseados em quimioterapia e radioterapia estão contra-indicados na gravidez ou prenhez, devido ao risco de teratogenia fetal, além da potencialidade de mutagênese às futuras gerações (GHELMAN, 2003). Isto reforça a opção de uma terapia complementar e imunomoduladora com ausência de efeitos colaterais à mãe e ao feto. Diversos estudos com o *Viscum album* injetável vem sendo realizados com a finalidade de comprovação dos efeitos benéficos em pacientes portadores de diversos tipos de câncer. Há a estimativa de que mais de 80.000 pacientes humanos

tenham sido tratados com a Terapia Homeopática Injetável nos últimos 30 anos, complementando o tratamento convencional nos seres humanos (KAEGI, 1998). Embora diversas pesquisas in vitro tenham sido publicadas ainda são necessárias novas averiguações e análises, minudentes e sistemáticas, que afirmam maior credibilidade ao método. O presente estudo in vitro foi realizado no intuito de esclarecer dúvidas sobre a eficácia terapêutica e o uso das concentrações adequadas, no combate às células Caco-2 por meio da ERD (Espectroscopia Raman Dispersiva).

1.1 Objetivos

-Verificar a ação do *Viscum album* in vitro como antineoplásico em Adenocarcinoma de cólon para utilização terapêutica na Medicina Veterinária;

-Verificar se a Espectroscopia Raman Dispersiva (830nm) poderia ser usada para determinar a eficiência Antineoplásica do extrato injetável do *Viscum album* nas concentrações de D3 (0.1 µg/mL), D6 (0.1 ng/mL), D9 (0.1X10⁻³ ng/mL), D12 (0.1X10⁻⁶ ng/mL) e D30 (0.1X10⁻²⁴ ng/mL) em cultura das células Caco-2;

-Comparar os espectros Raman da suspensão das células obtidas após a inoculação do extrato vegetal na cultura das mesmas, obtendo-se, assim, a correlação e a porcentagem da viabilidade celular através da mensuração da atividade mitocondrial, fornecida pelo teste do ensaio de MTT Assay.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espectroscopia Raman

Como já apresentado a espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, tendo por objetivo a determinação dos níveis de energia dos átomos e moléculas (SALA, 1995). As técnicas de espectroscopia utilizando a luz como uma fonte da excitação tal como a Fluorescência e a Espectroscopia de Raman, foram aplicadas na caracterização dos materiais desde o começo do século XX. Dentre elas se destacam as usadas por Rayleigh em 1871 e Einstein em 1910.

No entanto, foi o indiano CHANDRASEKARA VENKATA RAMAN quem demonstrou experimentalmente o fenômeno conhecido por Efeito Raman (TWARDOWSKI; ANZENBACKER, 1994) o qual constitui o espalhamento o espalhamento inelástico de radiação eletromagnética e monocromática que interage com as moléculas. As frequências vibracionais são determinadas pelas diferenças entre as frequências de radiação espalhadas e radiação incidentes (SALA, 1995; HANLON et al, 2000).

A evolução dos Espectros Raman veio com o surgimento do Laser em 1960, por sua propriedade monocromática (MAIMAN, 1960), pois inicialmente os Espectros Raman eram obtidos utilizando-se uma fonte não coerente de luz, como a radiação solar(MAIMAN, 1960).

No campo biomédico, a identificação e a caracterização das amostras biológicas, por meio da excitação do laser, foram iniciadas no final dos anos 70, com o uso da Espectroscopia de Fluorescência para detectar e identificar tecidos benignos e malignos (PROFIO; DOIRON, 1977; ALFANO, 1984) de modo que o primeiro espectro de Raman foi de uma proteína, obtida usando-se um laser He-Ne como fonte da excitação (LORD, 1970). Das duas técnicas, a Espectroscopia de Raman apresenta vantagens porque pode fornecer o maior número de informações

detalhadas sobre a composição química da amostra sob o estudo (HANLON et al, 2000).

Atualmente o Laser (Luz Amplificada por emissão de radiação) possui múltiplas funções na Medicina, tais como a de Diagnóstico, a Terapêutica, a Cirúrgica, tendo como características a Luz Monocromática e unidirecional, pois caminha paralelamente, o que lhe concede alta densidade de potência (W) e coerência (fótons com frequências sincronizadas).

A Espectroscopia Raman é aplicada para a caracterização de doenças humanas, *in vitro* e *in vivo*, tais como o câncer (CHOWDARY et al, 2007; NUNES, 2003), doenças vasculares, principalmente Aterosclerose, Mal de Alzheimer (MOTZ et al, 2006) e também para a análise de fluidos corpóreos como sangue, urina e suor (PILOTTO et al, 2001; QU et al, 1999). Os resultados mostram a possibilidade de identificar a evolução da doença através da análise de mudanças bioquímicas na estrutura da célula.

Os espectros Raman de uma molécula consistem em uma série de picos ou faixas, cada um fornecido por frequência vibracional inerente a cada molécula. Em consequência, o Raman fornece a impressão digital de uma substância cuja característica molecular pode ser determinada (LORINCZ et al., 2004). A obtenção dos espectros Raman das amostras são provenientes da irradiação de uma fonte de Laser potente, monocromática na região do visível ou infravermelho próximo. A radiação espalhada é medida em cm^{-1} em um determinado ângulo com espectrômetro apropriado (SKOOG et al., 2002). Em medidas cada cm^{-1} equivale a 30.000 Megahertz, ou seja, 10.000 vezes menor que a frequência da luz (HANLON et al., 2000).

A Medicina Veterinária é uma das áreas que poderia tirar proveito dos avanços na identificação de doenças, através dos métodos óticos, devido à alta sensibilidade nas mudanças espectrais. Estes têm sido utilizados nas pesquisas para proporcionar um diagnóstico precoce e em tempo real, *in vitro* e *in vivo* (LORINCZ et al., 2004). O número de diagnósticos de câncer em animais de estimação tem

aumentado nos últimos dez anos, o que pode ser atribuído aos avanços das tecnologias utilizadas, promovendo uma melhoria aumento na longevidade dos mesmos(ROSENTHAL, 2004). O uso de substâncias químicas, tais como corantes e conservantes) utilizados em alimentos, as radiações malélicas das antenas de celular, poluentes ambientais e uso de hormônios progestágenos, são, também causas do maior número de pacientes com neoplasias.

A ação Bioquímica dos medicamentos obedece às Leis da Física para todas as vias de administração (LOACES et al, 2002).A maioria dos tratamentos homeopáticos utiliza medicamentos altamente diluídos além do número de Avogadro, produzindo efeitos biológicos.Isto também é verificado através do efeito Raman - Laser (VIJNOVSKY, 1983).

Luu et al.,1975, utilizaram a Espectroscopia Raman-Laser, no estudo das variações do espectro do etanol a 70° sob efeito das diluições sucessivas de duas substâncias: a Bryonia e Aesculus, da 1 CH ao 30 CH.Tomou-se como critério os cinco picos mais característicos do etanol, onde observou que a Bryonia tinha três bandas distintas: de 1CH a 7CH, crescimento progressivo de intensidade que corresponde à desconcentração molecular proposta de 7 CH a 10 CH. Mantém, porém, a intensidade em bandas, do 10 CH ao 30 CH, decrescendo lentamente com curva arredondada. De acordo com as análises, estas oscilações de variações espectrais devem-se às variações da constante dielétrica do etanol, referente a natureza do princípio ativo e da diluição. Numa segunda experiência, utilizando Aesculus, observa-se uma influência das diversas dinamizações onde o número ótimo, nas condições experimentais seria 275. Infelizmente, resultados dos trabalhos realizados não puderam ser confirmados, pois estes revelaram-se não reprodutíveis.

A Física dos sistemas dinamizados continuam sendo o grande desafio para comunidade acadêmica, apesar dos 200 anos de existência da Homeopatia, das experiências clínicas e dos resultados expressivos, estes ainda são postos em dúvida, devido à insuficiência de informações que caracterizem a o fenômeno,

limitando os experimentos a meras hipóteses. A ausência de evidências não significa evidência de ausência (FONSECA; CASALI, 2006).

2.2 Origem do *Viscum album*

Os medicamentos homeopáticos tem sua origem a partir do reino animal, do vegetal, do mineral e da química. A medicação utilizada neste experimento é vegetal (SUTIAK et al, 2002). O *Viscum album Linnaeus*, uma subespécie da família *Viscacaceae* também, denominada Mistletoe na língua inglesa, é uma planta medicinal, da família das Lorantáceas, caracterizada por ser um semiparasita de diversas árvores hospedeiras da Europa, África, Ásia e Japão, dentre elas a Macieira, o Carvalho e o Pinheiro. Em 2002, um estudo botânico realizado na República da Eslováquia, detectou uma substância citotóxica presente na Viscatoxina, dando início às pesquisas visando culturas de células vegetais e animais, bem como avaliação da atuação desta em humanos (SUTIAK et al, 2002).

2.3 Antroposofia e Homeopatia injetável

No séc. XVIII Rudolf Steiner (1861-1925) o pai da Antroposofia, e a médica Ita Wegman, introduziram o Mistletoe no tratamento do câncer, dando origem aos primeiros tratamentos aplicados em pacientes com Carcinoma. Posteriormente, os medicamentos descritos, tiveram suas propriedades terapêuticas devidamente testadas no estudo dos processos patológicos, em busca de sua correlação, para uma indicação precisa, pois não se aplicam descobertas ao acaso (GARDIN, 1988).

Estima-se que mais de 80.000 pacientes humanos tenham sido tratados com a Terapia Homeopática Injetável, nos últimos 30 anos, como complementando ao tratamento convencional (KAEGI, 1998). As vias de administração, normalmente, são a subcutânea, a intravenosa ou a peritumoral (GHELMAN, 2003). A Alemanha

responde por 80% da produção dos homeopáticos injetáveis, confirmando as pesquisas do médico homeopata Reuter, em 1912, onde se verificou que a incidência de reações adversas é de um caso para 27, 777 aplicações (REUTER, 1925). Foram testados, também, eficazmente contra doenças reumáticas, mostrando baixa incidência de efeitos adversos, particularmente quando aplicado por via subcutânea, sendo que 77,1% dos médicos interrogados consideraram sua eficácia maior que a alopáticos (HEEL, 2000). Em 1981, o médico alemão, Dr.Regweg, cria a Homotoxicologia que se define como completa e ampla, pois une conhecimentos contemporâneos aos postulados da Homeopatia Hahnemaniana. Ele define o Câncer como um processo dinâmico com tendência progressiva à inflamação e quando não consegue se resolver evolui morbidamente acumulando homotoxinas, sendo, imprescindível uso das fórmulas antihomotoxicas (HELL, 1997), já que a Lei dos Semelhantes não seria totalmente aplicável ao câncer, em função da multifatorialidade sintomática exibida por cada organismo. Experimentos atuais relatam que os medicamentos homeopáticos não produzem sintomas semelhantes aos do câncer sendo, pois, impossível reproduzir a patogenia nas pessoas saudáveis (BELLAVITTE, 2005). Na Alemanha, cerca de 60% dos pacientes humanos, portadores de Carcinomas, procuram terapias complementares à convencional Isto se deve à redução de efeitos colaterais da terapêutica convencional, à melhoria na qualidade de vida e ao melhor incremento da condição imunológica (GARDIN, 2003).

2.4 Experimentações com *Viscum album*

O *Viscum album* é composto por uma diversidade de substâncias já identificadas. Atualmente, dois grupos farmacológicos de grande interesse estão sendo pesquisados: Viscotoxinas e Lectinas. São compostos protéicos que exercem citotoxicidade e são, também, cancerostáticos e imunomoduladores, diferindo-se pela estrutura molecular, pela farmacologia e pela localização no vegetal (GARDIN, 2003).

Pesquisas *in vitro* verificaram que o *Viscum album* inibe o crescimento celular de várias linhagens cancerígenas, incluindo fibroblastos, ao produzir um efeito citotóxico, agindo na membrana celular e induzindo a apoptose através da ação das Lectinas (LOACES; LUIS; CABRERA, 2002). As Viscotoxinas são polipeptídios que induzem a morte celular rápida por necrose, através dos efeitos imunomoduladores ainda pouco explicados (GARDIN, 2003; KIENLE, 2005). Ao último grupo identificado de carboidratos do qual fazem parte a glicose, a galactose, a manose, o inositol e os rabinolactanos, é atribuído o efeito imunoestimulante que atua nas células NK tumorais, causando a ativação do sistema complementar. O mistletoe foi classificado como um tipo de Agente Modificador da Resposta Biológica, ou seja, são substâncias sintéticas ou naturais que alteram a relação hospedeiro-tumor, resulta num efeito antitumor. A garantia da ação destes agentes, nas terapias de tratamentos em câncer, é a presença de infiltrados monocíticos, linfocíticos e plasmocíticos infiltrados nos tumores, além de células T-linfocíticas. Deve-se também, a íntima relação do índice de pacientes oncológicos imunocomprometidos e a posterior documentação da remissão do câncer pelo uso de Imunomoduladores, comparados a rara demonstração da remissão espontânea e sem outros tratamentos. Acredita-se que este Agente Modificador tenha uma boa especificidade na discriminação entre células cancerosas e as normais, sendo potente para destruir um grande número de células tumorais impedindo a recorrência (ROSENTHAL, 2004).

Indicação clínica: Diabete, Hipertensão Arterial, Neoplasias e metástases, Epilepsia, vertigens, inflamações degenerativas das articulações e como imunoestimulante.

Estudos *in vivo* realizados (LEFEBVRE et al, 2007) em animais, verificaram que a combinação do *Viscum album* e da Vincristina injetável se mostrou eficaz como terapia Anti-neoplásica em cães portadores de TVT (Tumor venéreo transmissível), reduzindo o tempo de terapia quimioterápica e a leucopenia produzida pelo Sulfato de Vincristina foi reduzido. Em 2006 verificou-se, em um estudo com 80 gatos com Fibrosarcoma Felino, sua ação benéfica como terapia

coadjuvante a quimioterapia. Neste caso, porém, a via de administração foi oral (BLOSTIN, 2006). Estudos clínicos realizados exclusivamente com Homeopáticos injetáveis (Injectcenter), associaram o *Viscum album* em diluições diferentes D6, D9, D12 e D30 com *Thuya occidentalis* D9 e *Lachesis mutta* D9. Comprovou-se que esta combinação foi eficaz no controle da evolução de Osteocondrosarcoma de Radio e Hemangioma de Baço em cães e também conferiu boa analgesia sem utilização de outros fármacos alopáticos e sem provocar efeitos colaterais detectáveis clínico - laboratorialmente (LOPES et al, 2007).

Estes estudos clínicos foram encorajados por diversos estudos realizados *in vitro*, mostrando que a citotoxicidade do mistletoe foi comparada ao rícino, devido à similaridade estrutural química, que atua com lectinas tóxicas similares ao *Viscum album*. Os resultados sugeriram que os mecanismos citotóxicos do *Viscum album* inibem a síntese celular da proteína, os danos à membrana citoplasmática resultando na retração e morte da célula, através de um efeito tóxico no complexo de Golgi da célula e/ou um efeito antiangiogênico nas células endoteliais venosas que impedem o desenvolvimento da rede venosa responsável pela sobrevivência do tumor (AL-ACHI, 2005).

Em concentrações entre 10 e 100 ng/mL, os efeitos de citotoxicidade, parciais ou completos, foram observados como as doses dependentes. A ação anticâncer do mistletoe foi demonstrada em muitas linhagens de células de cancer de humanos e animais, tais como em ovário de hamster chinês, em linfoma de Dalton, em ascites, em Tumor de Ehrlich, em carcinoma nasofaríngeo humano, em leucemia e em carcinoma cervical humano (AL-ACHI, 2005). Verificou-se que a Apoptose induzida também ocorre com dose superior a 10ng/ml por indução da inibição da síntese protéica. Em doses de 30-100 ng/ml aumenta a [Ca] citotóxico (HAJTÓ, 2005).

O extrato do VA teve a atividade citotóxica significativa em cultura de Hep-2, onde as Lectinas do mistletoe I, II, e III exerceram efeitos citotóxicos na linhagem de câncer mama humano. Todas as lectinas do mistletoe inibiram o crescimento da

célula leucêmica e a lectina III do mistletoe, mostrou-se, aproximadamente, dez vezes mais citotóxica que a lectina I (LOEPER, 1999).

2.5 Uma visão do Câncer

Na antiguidade os faraós egípcios, que viviam em um meio ambiente mais saudável do que o de hoje, já possuíam alguma noção de Câncer, como as características que podem acarretar as modificações responsáveis pela malignidade. Tinham conhecimento de que as mudanças estão relacionadas a processos diários que ocorrem nos organismos e são geneticamente herdadas pelas células normais, levando, então, à somatização (GOGICHADZE; MISABISHVILI, 2006).

O Câncer é uma doença genética em mamíferos, aves e plantas, resultado da alteração da dupla fita do DNA sofrida por um grupo de células, que lhes confere independência no controle proliferativo. Porém, hoje se sabe que a patogênese do câncer tem incidência de fatores ambientais somados às mutações herdadas que alteram o genoma das células tumorais. Quando isto ocorre desencadeia três fatores importantes:

- ativação da oncogênese;
- alterações nos genes reguladores;
- apoptose e inativação de genes supressores do câncer.

A produção desse fator de necrose tumoral ou citocina é elevada em algumas doenças crônicas, como Câncer, AIDS, Artrite Reumatóide e outras. Essa produção elevada tem como consequência falta de apetite, dores musculares, perda de massa corporal. Algumas características intrínsecas foram observadas com a iniciação do processo cancerígeno, desde a 1ª mutação até seu aparecimento e muitas vezes, passam-se anos até se completar o ciclo, o que dificulta o diagnóstico e a prevenção (GARDIN, 2003).

Na figura 1 observamos a representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental, seguida da terapêutica e/ou endógena, aliadas ou não ao estilo de vida, como por exemplo, hábito tabagista e dieta inadequada. Os compostos carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos, preexistentes ou não, levam ao desenvolvimento do câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições, tais como etnia, idade, sexo, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos (PERERA, 1997).

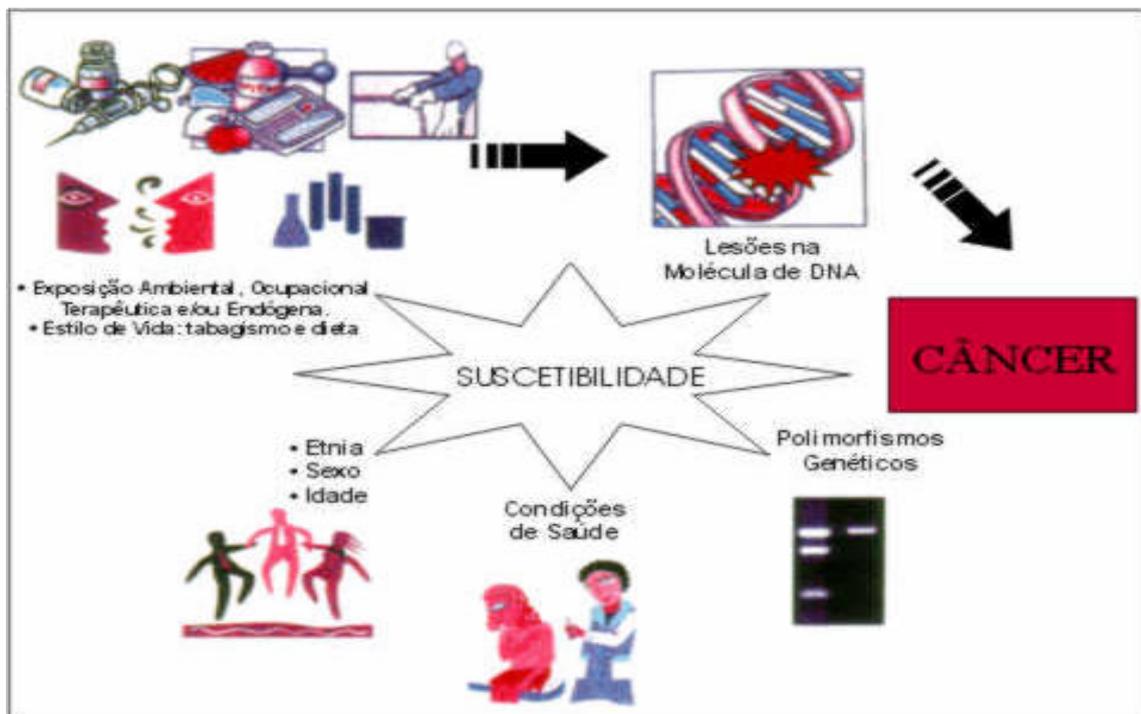


Figura 1: Representação esquemática da influência dos fatores que conferem suscetibilidade no processo de carcinogênese ambiental (PERERA, 1997).

A carcinogênese é um processo longo e multifatorial, podendo ser influenciado por fatores ambientais, biológicos e genéticos. Ocorre quando uma célula for exposta a um fator mutagenico que interage com DNA, desajustando os cromossomos. Alguns fatores de risco foram considerados, como os genéticos, pois

a predisposição ao desenvolvimento tumoral pode ser herdada ou acarretada por características fenotípicas tal como a coloração da pele, hormônios de uso prolongado como os contraceptivos e os microtraumas nas articulações em ossos longos (PERERA, 1997).

É necessário conhecer a biologia da célula cancerígena para que , através do mecanismo de atividade funcional, se possa chegar o mais próximo da detecção pela espectroscopia Raman. A estrutura básica de uma célula normal é constituída pela membrana celular, formada por lipídeos, fosfolipídios, colesterol e glicolipídeos, proteínas especializadas (STEVENS; LOWE, 2001). Porém basicamente 90% é água, sendo o restante peso seco. Carregam 50% de proteínas, 15% CHO, 15% ácido nucléico, 10% lipídeos e 10% outros tais como fósforo, enxofre, traços de sódio, magnésio, ferro, cloro, potássio, cálcio e os microoligoelementos. Contém, ainda, 60% de Hidrogênio, 25% O₂, 12% Carbono e 5% Nitrogênio (KRAFFT, 2003).

A célula neoplásica tem material nuclear com aumento da concentração da relação núcleo-citoplasmático, podendo chegar até 1:1, quando o normal seria 1:4 ou 1:6, além de um aumento da atividade mitótica, má distribuição da cromatina e ausência da diferenciação celular. Ocorre ainda uma perda da maturação celular e proliferação das células indiferenciadas, resultando aumento da atividade metabólica (MAHADEVAN-JANSEN, 1996).

Muitas esperanças foram depositadas nas pesquisas médicas desde a década de 1970. No entanto, a melhoria significativa no tratamento do câncer, para humanos e para animais, tornou-se realidade, principalmente, diante dos conhecimentos atuais de imunooncologia. Apesar do aumento da incidência da doença, tivemos uma melhora na qualidade de vida dos pacientes, chegando mesmo a uma sobre-vida, quando estes são submetidos a terapias não convencionais como Homeopatia, Oligoterapia, Medicina Vibracional entre outras.

Desta forma foram necessários estudos de outras estratégias terapêuticas complementares e seus efeitos já são observados nos percentuais de cura de muitas neoplasias. Tal fato é inerente também, ao progresso médico, através dos recursos

terapêuticos na oncologia mais eficazes e menos tóxicos que incluem, ainda, a ativação controlada do sistema imunológico antitumoral (GHELMAN, 2003).

Os estudos e as pesquisas sobre as neoplasias de cólon são de grande relevância na medicina, principalmente na área histopatológica, considerando sua frequência e o aumento progressivo de sua incidência, pois já ocupa o 5º lugar em mortes no mundo (SANTOS et al., 2005).

2.6 Terapias antineoplásicas

Nas duas últimas décadas vem sendo usada na Oncologia Veterinária à chamada Terapia Medicamentosa dos Tumores, associação de citostático alquilantes, citostáticos antibióticos, citostáticos antimetabólicos e antimetabólicos hormonais, a popularmente conhecida quimioterapia (STAINK, 2000). Destacamos daí a mais usada, um alcalóide obtido da Vinca Rósea (Sulfato Vincristina) cujo mecanismo de ação consiste em impedir a formação de microtúbulos no fuso mitótico, o que inibe a divisão celular na metáfase. Esta toxicidade provocada na célula tumoral, também afeta as células saudáveis, causando leucopenia, trombocitopenia, anemia, perda de pêlos e cabelos, perda de peso, úlceras, Hepatite tóxica, entre outros. Posteriormente a Medicina introduz o Antineoplásico Imunomodulador e os Antineoplásicos Vegetais a qual pertence o *Viscum album* (LOACES; LUIS; CABRERA, 2002), que será estudado com detalhes neste experimento, pois demonstra por estudos toxicológicos que, trata-se de uma medicação bastante segura (GARDIN, 2003).

Atualmente no Brasil, a INJECTCENTER, empresa devidamente autorizada pela ANVISA especializada na produção de produtos injetáveis e estéreis, confeccionando-os na forma homeopática injetável, a qual forneceu insumo homeopático desta pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E METODOS

A cultura das células Caco-2, as fotografias e o teste de quimio-sensibilidade MTT Assay foram realizados no Laboratório de Biocompartimentos Celulares, no IP&D na Univap.

3.1 Cultura Celular

As células Caco-2 (CR069, Adenocarcinoma de cólon) provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro foram mantidas no Laboratório de Biocompartimentos Celulares do IP&D. A linhagem celular foi rotineiramente cultivada em Meio Mínimo Essencial (MEM Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mM/mL), e fungizona (0.25 µg/mL) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As células Caco-2 são extraídas de Adenocarcinoma de cólon humano, cultivados em filtros permeáveis e porosos, se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma membrana composta de células em monocamadas aderidas por junções e apresentam como vantagem a rápida multiplicação celular (Balimane *et al.*, 2000). O emprego de co-solventes orgânicos (metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol) em concentrações maiores que 1-2% (v/v) durante os estudos de permeabilidade deve ser limitado, pois comprometem a integridade dessas junções (Balimane *et al.*, 2000). Inicialmente as células são cultivadas em meio líquido Eagle suplementado com 10% soro de feto bovino contendo 1% de antibiótico (penicilina e/ou estreptomicina) e aminoácidos. As células são cultivadas à temperatura de 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico (Benet *et al.*, 2004).

A preparação das células da monocamada requer um período de cultura de três semanas. Entretanto, este tempo pode ser reduzido para menos de uma semana por modificações simultâneas no material de revestimento dos filtros e no meio de crescimento. A redução no período de cultura proporciona monocamada funcional

com maior produtividade, além de reduzir a contaminação por fungos/bactérias (Chong *et al.*, 1997). Apesar destas limitações, este é o modelo mais empregado no momento e permite obter importantes informações para o estudo de novos fármacos.

3.2 Aquisição das imagens das células

Todas as placas das culturas de células foram realizadas por foto-micrografia usando um Microscópio Óptico com objetiva L40 X 0,50 (Leica, DMLI modelo 527001) e analisada com software Leica Qwin.

3.3 Características Farmacológicas

A) *Viscum album*

O extrato vegetal foi adquirido do Laboratório Schraibmann (Alemanha), lote 004 A/07, consiste em um líquido marrom escuro, solúvel em água e álcool, com densidade 0,810 a 0,990 e teor alcoólico 62 a 68%.

Sinonímias: Mistletoe, *Viscum baccis albis*, Família: Viscaceae;

Habitat: Europa e Ásia temperada;

Parte usada: toda planta a 10% TM;

Foram utilizados ampolas do Homeopático *Viscum album* D3 (0.1 µg/mL), D6 (0.1 ng/mL), D9 (0.1X10⁻³ ng/mL), D12 (0.1X10⁻⁶ ng/mL) e D30 (0.1X10⁻²⁴ ng/mL).

Apresentação: ampolas com 1.1 ml *Viscum album*, produto final, obtido por processo de fermentação láctica e diluído em solução salina isotônica a 0,9%, em concentração a ser utilizada de acordo com a Farmacopéia, lote 004 A/07. É considerado um Agente Modificador da Resposta Biológica e complementar a terapia quimioterápicas em humanos;

B) Sulfato de Vincristina: é um sal alcalóide obtido da *Vinca Rósea* L cujo mecanismo de ação está relacionado com inibição da formação de microtúbulos no

fuso mitótico, onde ocorre uma parada na divisão celular na metáfase. Portanto se trata de um quimioterápico convencional.

Apresentação: frasco ampola com 1ml de água destilada e pó liofilizado com Sulfato de Vincristina (Vincrifil®), com 1mg/ml, lote: 003/06.

3.4 Cultura celular para Espectroscopia Raman

As células Caco-2 (colo-retal), foram cultivadas em placas de 96 poços, com meio MEM suplementado com 10% de SFB. As células foram inoculadas com 100µl de cada um dos extratos *Viscum album* (de acordo com os grupos) e 0.01 µg/mL do quimioterápico Sulfato de Vincristina. Para a leitura na espectroscopia Raman foi analisado após de 72 horas de incubação com *Viscum album* e Sulfato de Vincristina, ocorrendo uma nova administração dos produtos com intervalo de 24 horas, realizado no Laboratório de Espectroscopia, no IP&D da UNIVAP.

Grupos:

G1 - VA D3+ células Caco-2

G2 - VA D6 + células Caco-2

G3 - VA D9 + células Caco-2

G4 - VA D12+células Caco-2

G5 - VA D30+células Caco-2

G6 - Sulfato vincristina+células Caco-2

G7 - Células Caco-2

3.5 Cultura Celular para MTT:

As culturas celulares incubadas com o Viscum album e Sulfato de Vincristina, nas concentrações D3 (0.1 µg/mL), D6 (0.1 ng/mL), D9 (0.1X10⁻³ ng/mL), D12 (0.1X10⁻⁶ ng/mL) e D30 (0.1X10⁻²⁴ ng/mL), foram analisadas por microscopia óptica, sendo registrado através de fotomicrografias que documentaram o aspecto das células.

Para análise da citotoxicidade, foi utilizado o teste de MTT (1mg/ml) ((4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT, Sigma, St. Louis, MO), que consiste num método químico-físico destinado a verificar a viabilidade celular e citotoxicidade do agente em questão.

Para este teste foi retirado todo o meio de cultura e adicionado 200µl de MTT e incubado a 37°C por 1 hora. Após este período adicionou-se 200 µl de DMSO (Dimetil sulfóxido) com agitação por 30 minutos para diluição dos cristais de formazana. A leitura foi realizada no Espectrofotômetro Spectra Count TM (Packard), com filtro de 570nm.

3.6 Sistema de Espectroscopia Raman Dispersivo

O sistema Raman Dispersivo usado para coletar o sinal de Raman está apresentado na figura 2. É composto por uma fonte da excitação, através de um Laser de Diodo (micro laser Systems Inc., L4830S modelo) em 830nm, com densidade de potência aproximadamente de 80 mW. Um espectro Raman é obtido quando a luz monocromática de um laser incide sobre a amostra que se deseja estudar. A luz é espalhada em todas as direções, quase que isotropicamente, mas só é possível coletar aqueles fótons que atingirem a abertura do espectrógrafo. Em seguida, a luz é dispersa por uma rede de difração dentro do espectrógrafo e seus componentes são recolhidos em um detector que converte a intensidade da luz em

sinais elétricos que são interpretados em um computador na forma de um espectro Raman.

A câmera CCD (Charge-Coupled Device) foi inventada em 1970 por Boyle e Smith, pesquisadores dos conhecidos laboratórios Bell. Porém seu uso como um detector para a ER foi relatado apenas dezessete anos mais tarde (BOYLE; SMITH, 1970). Os CCD's são detectores de silício que convertem fótons em sinais elétricos. Cada elemento do detector é chamado de píxel, uma contração de *picture element*. Assim, para reduzir este problema do ruído recorreu-se à refrigeração da câmera CCD por nitrogênio líquido, diminuindo a interferência vibracional das moléculas do próprio equipamento de detecção, reduzindo, assim, o ruído térmico. Este dispositivo multicanal, com excepcional sensibilidade e ruído intrínseco muito baixo, melhorou a relação sinal-ruído e a velocidade de aquisição dos dados. O sistema Raman do IP&D está ajustado para operar em -95° , podendo atuar na faixa de 80° a -140° C.

A figura 2 mostra a disposição do equipamento utilizado para o experimento no Laboratório de Espectroscopia do IP&D.

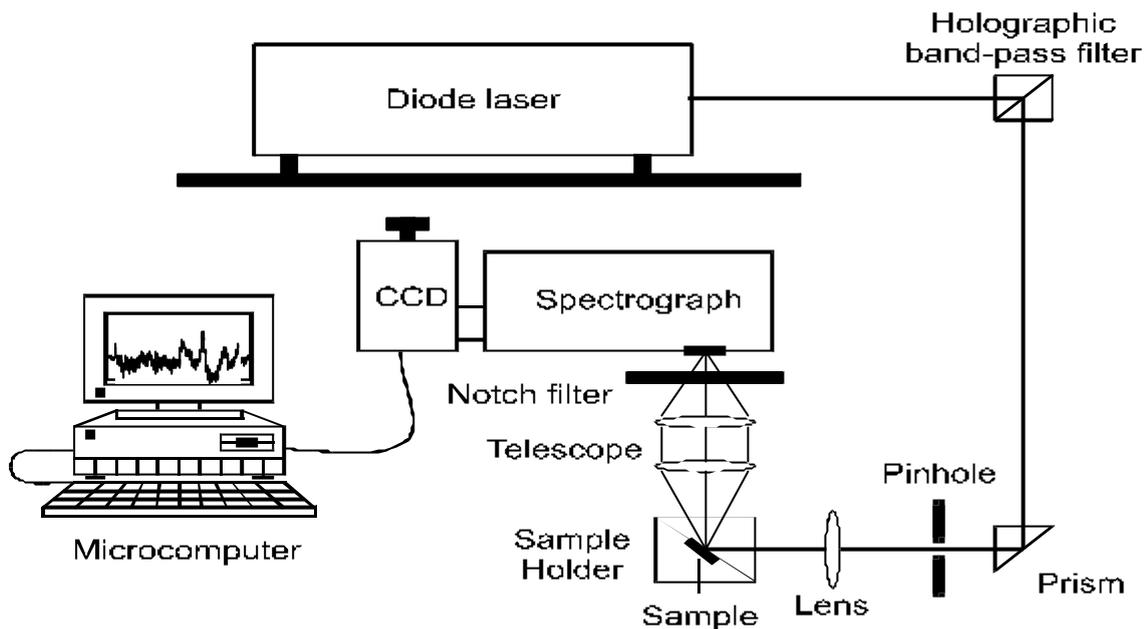


Figura 2: Diagrama esquemático da Espectroscopia Raman Dispersiva a 830nm potencia de 80mw do laser e escala espectral de 800 a 1800 cm^{-1} . Fonte: (SATHAIAH, 1996)

A figura 3 demonstra a cubeta de quartzo (material utilizado para acondicionar as células) em frente ao laser.

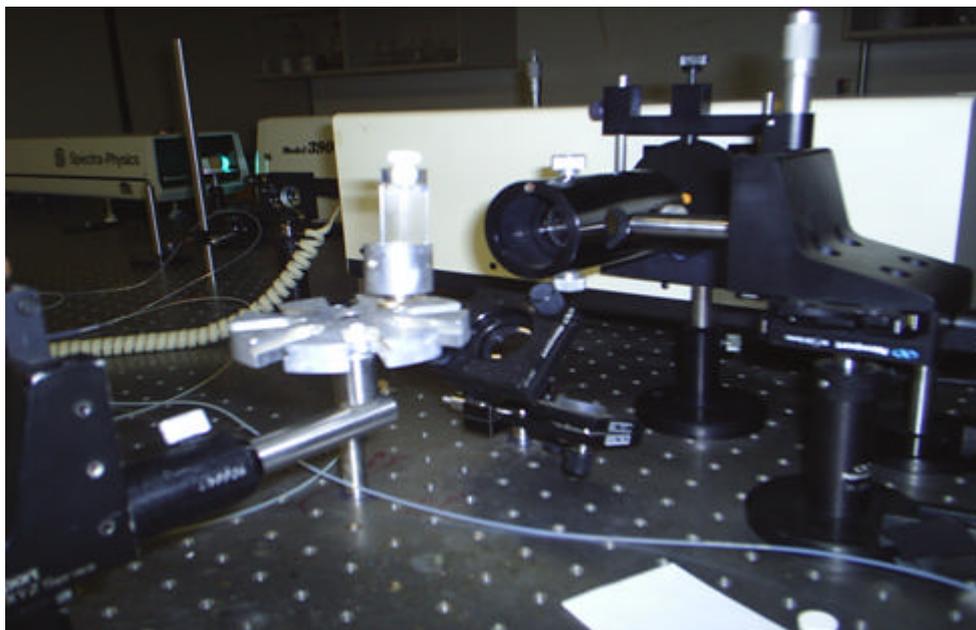


Figura 3: Cubeta de quartzo no porta amostra

3.6 Processamento dos Espectros

O sinal Raman é coletado por um espectrógrafo Chromex, modelo 250IS e analisado em um detector (CSMA) Princeton Instruments, Modelo LN/CCD – 1024 x 256 pixels – EHR/1, refrigeração a -95° C com nitrogênio líquido. Controlada por computador, a abertura da fenda do espectrógrafo foi ajustada em 200 μ m e a aquisição do sinal foi configurada para realizar uma única acumulação com 30 segundos para cada espectro.

A obtenção dos espectros Raman encontra uma das maiores dificuldades que é a presença da Fluorescência do tecido biológico. A subtração computacional foi facilitada através de programas que melhoram crescentemente (KHALIL, 1999). O gerenciamento do sistema Raman é feito através do Winview ©, que também dispõe de função específica para o tratamento dos espectros, além de exportar dados em formato universal para que o processamento das informações possa ser realizado em outro aplicativo. Aqui optamos pelo Matlab ©. e reescalados em uma faixa de 800 a 1800 cm^{-1} .

3.7 Análise Estatística Multivariada

Os espectros Raman processados foram submetidos à análise estatística multivariada, a fim correlacionar à viabilidade da célula medida com o teste de MTT e a informação espectral dos sinais Raman. O método de regressão multivariada para o tratamento dos dados do experimento foi o PLS (Regressão por quadrados mínimos parciais) que permite utilizar todo o espectro Raman melhorando a previsão, já que as variações podem ocorrer não somente no pico, mas nas larguras da banda. Seu objetivo é encontrar uma relação da matriz de dados que contém os espectros das amostras e o vetor que armazena as concentrações das células.

A Quimiometria é um termo que designa o uso de ferramentas estatísticas multivariadas para o planejamento e a otimização das condições experimentais e para a análise de dados. Na Indústria Química, ferramentas quimiométricas, aliadas

às técnicas instrumentais, têm sido empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para as áreas de Pesquisa e Desenvolvimento, Controle de Qualidade (matéria-prima e produto acabado) e Monitoramento de Processos (FERREIRA, 1999).

Sua base é o PCA (Principal Componente da Análise), onde a manipulação da matriz dos dados significa as variações presentes nas variáveis por um número menor de fatores. A VL (Variável Latente) é a máxima quantidade de componentes que o sistema pode detectar, representando como média a VL1 e como desvio padrão a VL2(CUNHA JR. et al., 2003).

O PLS é relativamente eficiente para lidar com ruídos, de modo que todas as variáveis são incluídas, sendo bastante utilizada em Engenharia e Química. A viabilidade da célula foi considerada como a variável independente e a intensidade fornecida pelo modelo de PLS a variável dependente. Então, toda a mudança que ocorre no espectro é dependente da quantidade de células viáveis e será correlacionada a algumas das variáveis de PLS.

4 RESULTADOS

A figura 4 apresenta o Espectro Raman do *Viscum album* e as células caco-2 na diluição D3 (0.1 µg/mL), sendo possível verificar as bandas de Raman na posição de 886, de 1062 e de 1635 cm⁻¹, que podem ser atribuídas à cubeta de quartzo. O eixo X representa a frequência da vibração molecular e fornece informações qualitativas da amostra. O eixo Y fornece a intensidade relativa do sinal que a amostra emitiu, porém, não é tão importante apesar de podermos comparar uma banda com outra.

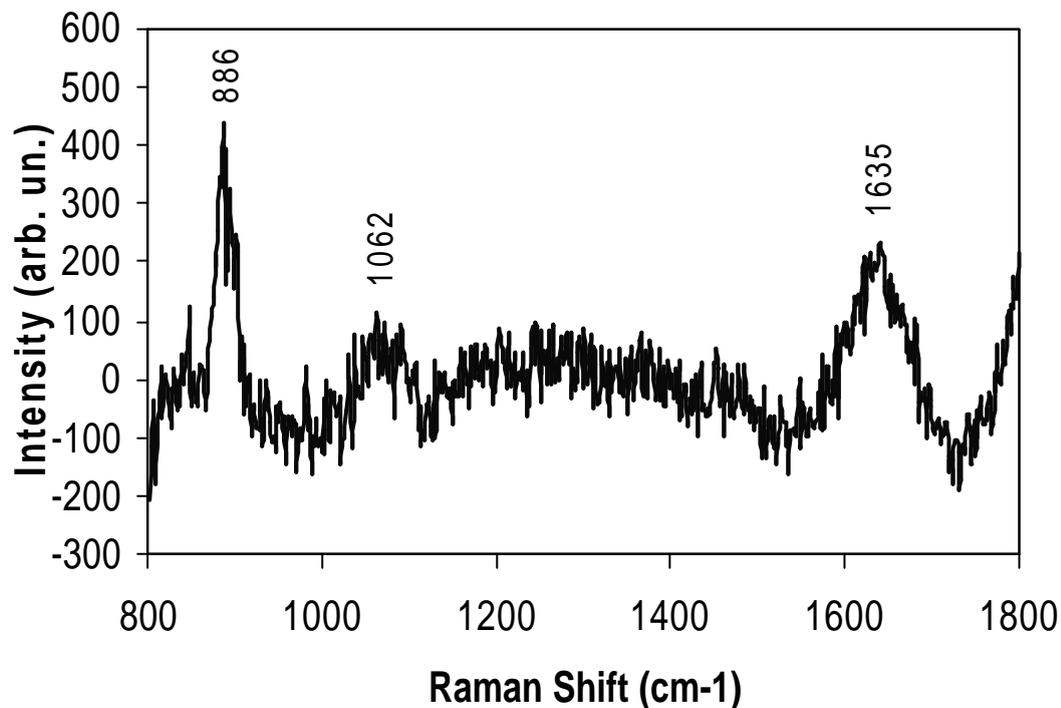


Figura 4: Espectro Raman da diluição D3 (0.1 mg/mL) com células caco-2.

A figura 5 representa em vermelho o espectro Raman da solução fisiológica a 0,9%, onde apenas são verificados os picos da cubeta de quartzo. Em azul verificamos o espectro Raman do Controle que são as células Caco-2 com meio MEM.

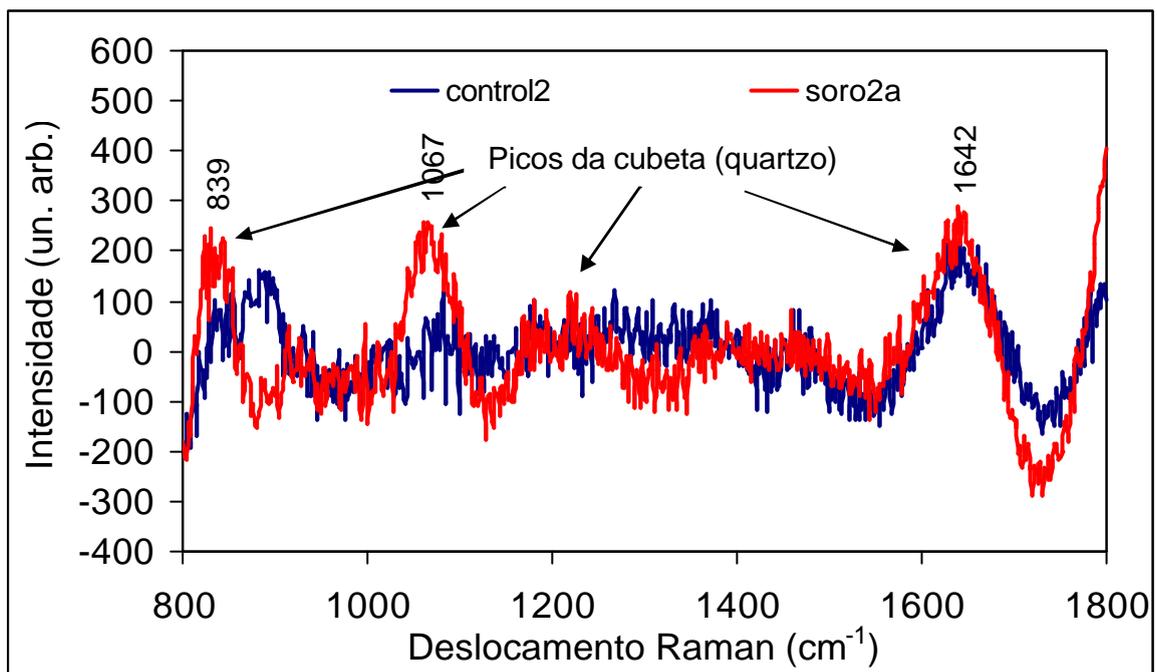


Figura 5: Picos Raman da Célula Caco-2 (Azul) e Solução Fisiol. 0,9% (vermelho)

A figura 6 mostra o espectro Raman com as cinco diluições de *Viscum album* com as células Caco-2 respectivamente, demonstrando que os picos da cubeta se repetem em ambas as diluições e que a faixa de 1200 a 1400 cm^{-1} caracteriza a presença das células Caco-2.

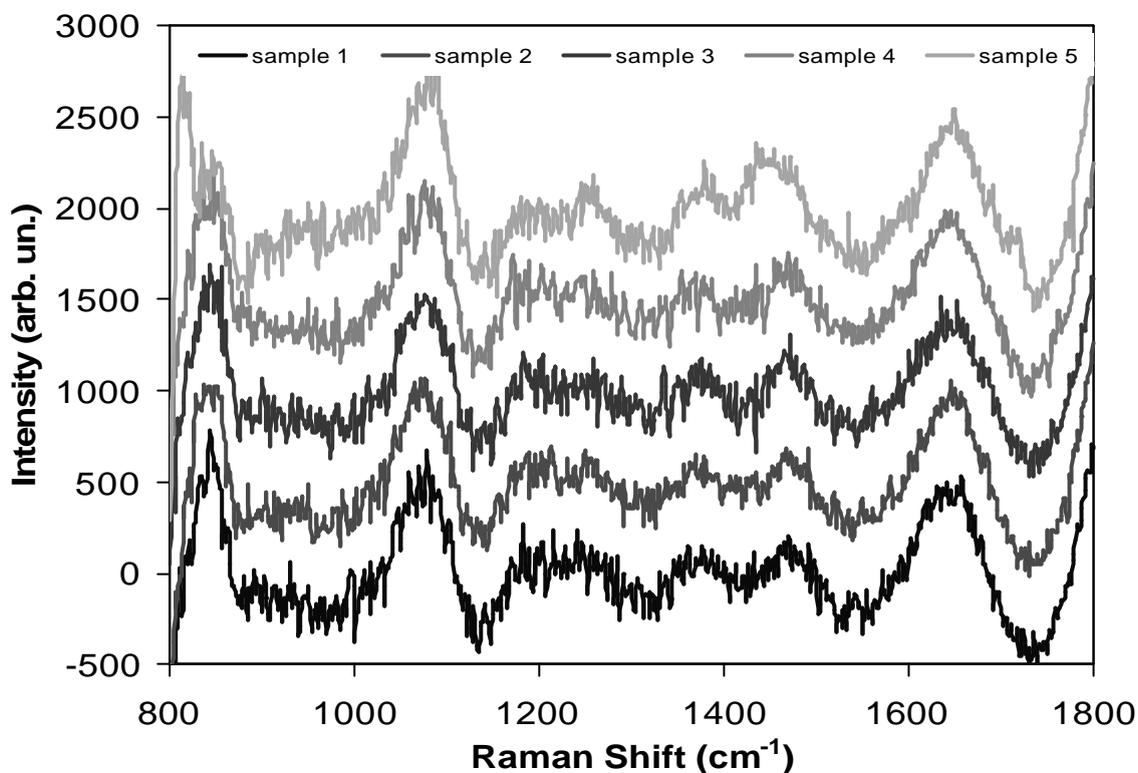


Figura 6: Picos da cubeta se repetem em ambas as diluições e que a faixa de 1200 a 1400 cm^{-1} caracteriza a presença das células Caco-2.

O PLS foi executado usando os espectros de Raman, representados pelo eixo X e a viabilidade celular representados pelo eixo Y obtidos do ensaio de MTT. Baseado nestas duas informações (espectros e viabilidade da célula), o modelo calcula a viabilidade prevista pelo sinal Raman. Devido ao fato de que somente algumas variáveis podem ser responsáveis pelas mudanças nos espectros das células Caco-2, isto é, a viabilidade da célula, o modelo de PLS foi executado usando somente as primeiras duas variáveis latentes.

Sabendo-se que somente uma das variáveis poderia ser responsável pelas mudanças ocorridas no espectro das células Caco-2 após a incubação *Viscum album*, a influência da primeira variável latente foi removida do espectro. Pode-se observar uma mudança na intensidade relativa das faixas de Raman, principalmente na região espectral em 1200 a 1600 cm^{-1} . Esta região espectral é caracterizada por

faixas principalmente das proteínas e dos lipídeos das células e dos tecidos. As faixas abaixo de 1200 cm^{-1} e acima de 1600 cm^{-1} podem ser atribuídas à cubeta de quartzo.

Na figura 7 mostra o espectro das primeiras duas variáveis latentes do modelo de PLS.

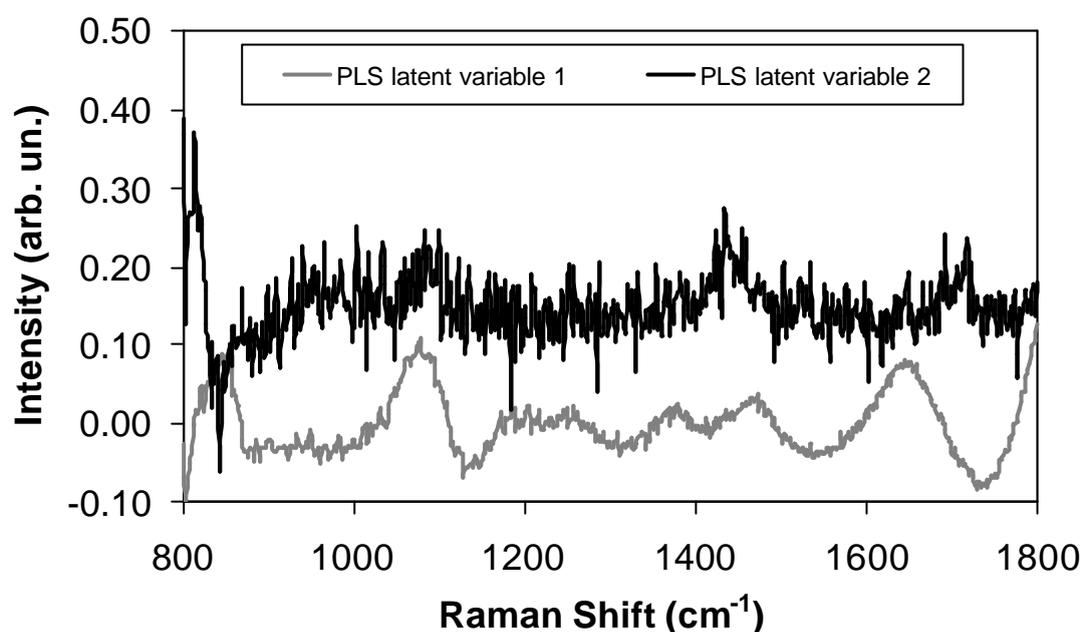


Figura 7: Gráfico dos primeiros dois espectros com as duas variáveis latentes do modelo de PLS, mostrando características espectrais principais.

Os resultados do ensaio de MTT, mostrados na figura 8, indicam que o *Viscum album* atuou na atividade mitocondrial celular, reduzindo a viabilidade concentrações de D3 ($0.1\ \mu\text{g/mL}$), D6 ($0.1\ \text{ng/mL}$), D9 ($0.1 \times 10^{-3}\ \text{ng/mL}$) quando inoculados nas células Caco-2, enquanto que o quimioterápico Sulfato de Vincristina (VIN) não demonstrou nenhuma ação em viabilidade celular.

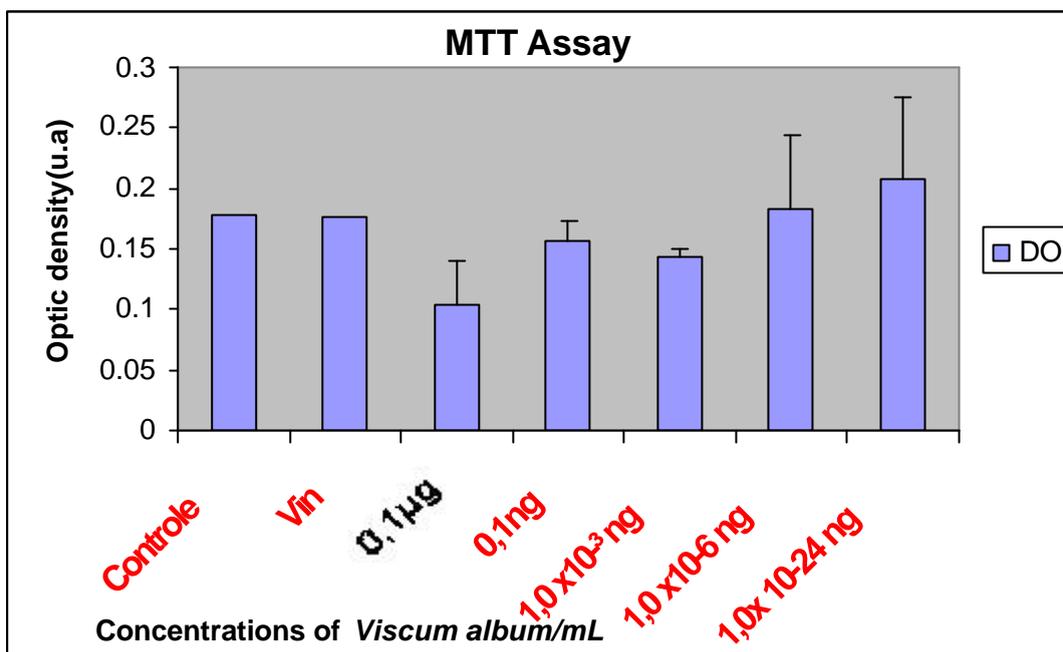


Figura 8: Teste MTT Assay, onde a viabilidade celular foi medida pela densidade óptica, demonstra que a ação dos VAD3 (0.1 µg/mL D9 (0.1X10⁻³ ng/mL) e foram os que atuaram melhor na diminuição da viabilidade celular comparando com o (VIN) Sulfato de Vincristina a 0,01µg/mL.

A figura 9 mostra o resultado do PLS utilizando uma variável latente, enquanto que na figura 10 mostra o resultado do PLS utilizando duas variáveis latentes.

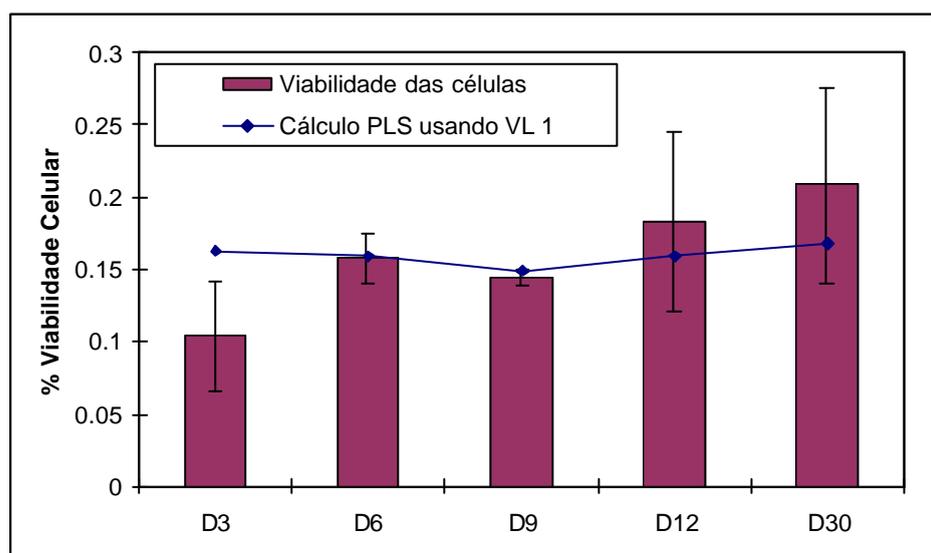


Figura 9: Análise estatística correlacionando % Viabilidade celular com primeira variável latente

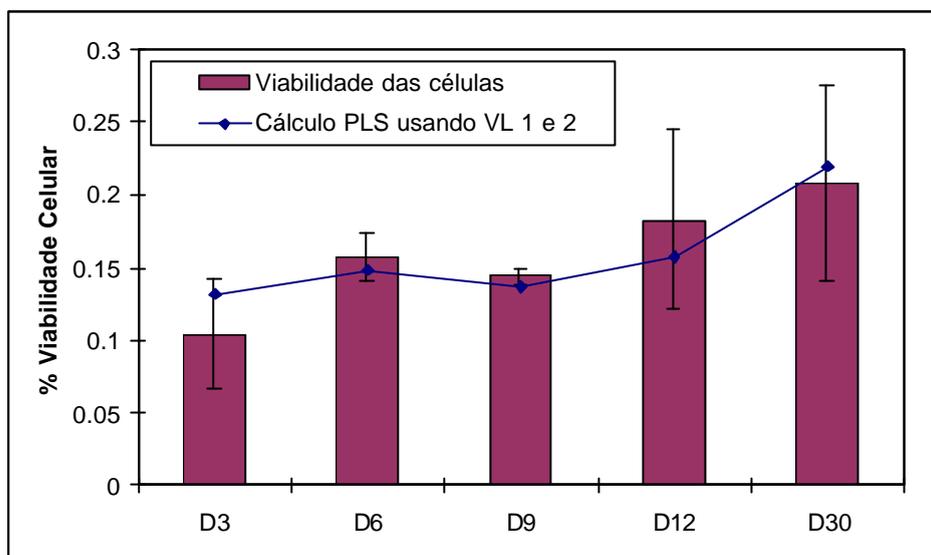


Figura 10: Análise estatística correlacionando a % Viabilidade celular com as 2 principais variáveis

Na figura 11 mostra o resultado PLS, tendo sido subtraído a primeira variável latente dos espectros. Este espectro foi corrigido somando o valor médio do componente nº1 para avaliar só a influência do componente nº 2. Neste gráfico pode ser observada a boa correlação com os resultados calculados e medidos, mostrando a possibilidade de medir este parâmetro pela espectroscopia Raman.

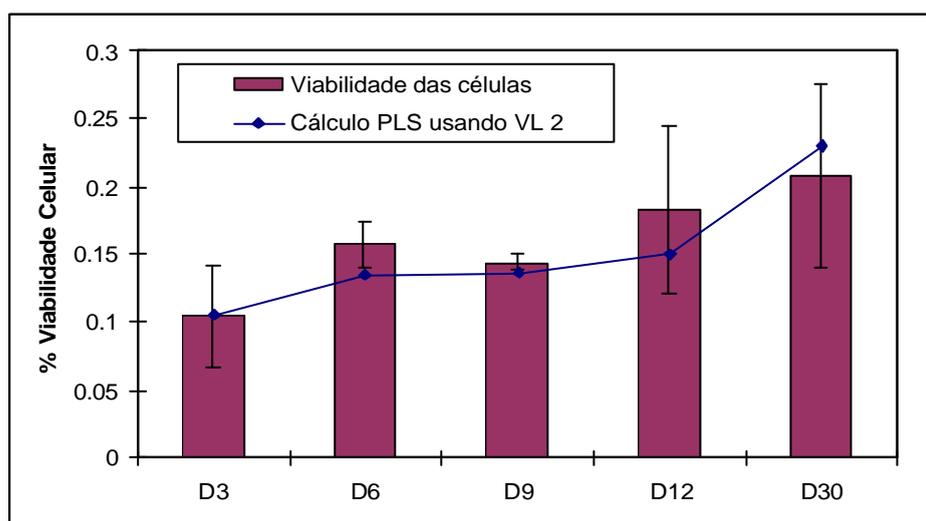


Figura 11: Gráfico de MTT Assay comparado ao PLS calculando Espectro Raman usando a segunda variável latente.

Na figura 12 podemos observar as fotomicrografias que serviram para o acompanhamento dos eventos ocorridos quando as células foram inoculadas com as diluições de *Viscum album*. Com estas imagens podemos sugerir a perda da viabilidade celular quando observamos a perda da adesão celular na cultura inoculada com *Viscum album*.

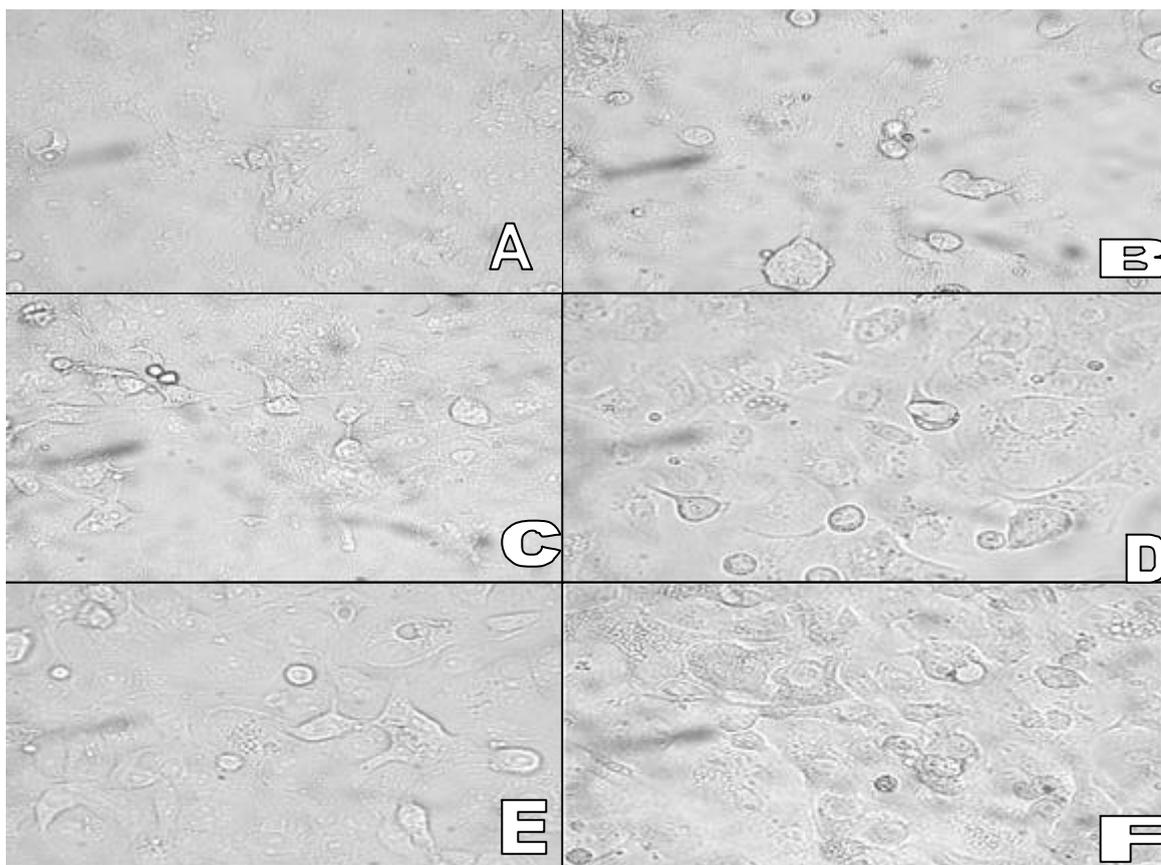


Figura 12: A- células Caco-2; B- células caco-2 e VA D3; C- células Caco-2 e VA D6; D- células Caco-2 e VAD9; E- células Caco-2 e VA D12; F- células Caco-2 e VA D30.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os métodos diagnósticos usados atualmente na oncologia para a confirmação da doença, isto é, padrão ouro assim chamado, são caracterizados por desvantagens tais de consumo do tempo e incerteza, sofrimento pela espera do laudo.

Com o método Espectroscópico Raman, as vantagens são a eficácia e a rapidez da verificação da compatibilidade terapêutica entre a droga e o paciente, o que permite mudanças estratégicas durante a terapia, com análise em tempo real, sem necessidade de procedimentos invasivos, e, com a vantagem de custos reduzidos (STONE et al, 2004). O sinal de Raman nas amostras biológicas é extremamente fraco (10^{-9}) e a emissão da fluorescência é um problema grave para coletar os sinais de Raman (ALCANTARA, 2002). Usando a excitação infravermelha do laser, a fluorescência pode ser reduzida a um mínimo.

O sinal de Raman das células Caco-2 era significativamente intenso, apesar da baixa concentração de célula (2×10^5 células/mL), mas as diferenças importantes foram verificadas nos espectros de células tratadas, principalmente na região de 1200 a 1600 cm^{-1} . Esta região está sendo caracterizada para fornecer a informação espectral das proteínas e dos lipídeos das células.

As diferenças encontradas neste trabalho para esta região podem ser usadas para determinar a viabilidade da célula. Isto pode ser confirmado pela análise da segunda variável latente de PLS (figura 11), com a faixa espectral principal na região 1440 cm^{-1} , em que tal informação forneceu a melhor correlação à viabilidade. As faixas entre 830 e 1620 cm^{-1} mostram as informações das proteínas estruturais (tirosina, triptofano, histidina e fenilalanina) (MAHADEVAN-JANSEN, 1996; STONE et al, 2004). Os nucleotídeos apresentam as faixas entre 1100 - 1700 cm^{-1} , que são ricas em bases nitrogenadas (MAHADEVAN-JANSEN, 1996). Frank et al., (1995), em um experimento que analisou espectros Raman de tecidos mamários, verificou

uma mudança importante na faixa de 1439 cm^{-1} em tecido normal para 1450 cm^{-1} no tecido maligno referente às proteínas malignas.

O ensaio de MTT é uma técnica atual para avaliar a viabilidade celular, especificamente a atividade mitocondrial MTT podendo ser relacionado à informação do espectro Raman fornecida pela proteína, desde que a atividade mitocondrial da célula cancerígeno possa ser correlacionada à quantidade da degradação da proteína (VELLEMAN, 1997) e tal degradação altera a dispersão e intensidade do Raman. Outro estudo mostra que a presença de *Viscum album* induziu a apoptose da célula relacionando 2 fatos à ativação da caspase e a inibição de proteínas anti-apoptóticas acelerando a morte da célula (KHIL, 2007).

É importante lembrar que o *Viscum album* não tem nenhum espectro Raman significativo (as faixas vistas são do quartzo) e não interferirá na leitura do espectro das diluições de *Viscum album* com as células Caco-2.

As culturas de célula do Adenocarcinoma possuem dois pontos avaliados por Espectroscopia Raman (CHEN, 2006). A concentração elevada de proteína e de ácidos nucléicos foi evidenciada em células neoplásicas quando comparada às células normais, demonstrando que Raman poderia ser um método útil da diferenciação. Conseqüentemente a quantidade destes compostos em células neoplásicas pode ser avaliada para analisar drogas anticancerígenas.

Bernall (1993) e Turing (1952) verificaram através da Espectroscopia Raman UV, IVP e a Fluorescência, que alguns resultados negativos foram associados à baixa resolução dos equipamentos de mensuração e relação a ajustes de sinal, variabilidades das amostras que podem interferir na interpretação de Homeopáticos.

Neste experimento in vitro com *Viscum album* sua atividade biológica citotóxica foi verificada, com dose inferior a 10ng/ml incubado por 24 e 72h, pois em cultura celular pode estimular as citocinas e proporcionar a morte programada. São efeitos interessantes uma vez que as lectinas da planta imitam as lectinas endógenas que nós produzimos e representam mecanismos adiantados de

eliminação das células cancerígenas (desconhecidos) promovendo a alteração de energia (glicose) na célula.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

*Pode-se concluir que a técnica de ERD no Infravermelho, combinado com o modelo estatístico de PLS, correlacionou os resultados do MTT, identificando principalmente mudança na informação espectral das proteínas celulares ligadas à viabilidade celular e a degradação das proteínas;

*A Técnica de ERD revelou ser um método valioso e sensível para a detecção da mudança na atividade mitocondrial das células Caco-2, quando submetido ao Homeopático *Viscum album*. As fotomicrografias serviram para acompanhar as transformações sofridas pelas células ao longo de 72 h sugerindo a diminuição da viabilidade celular com as diluições D3, D6 e D9 de *Viscum album*;

*É necessário entender melhor a biologia do Câncer, pois cientistas apostam que nos próximos 10-20 anos serão de vital importância para o conhecimento do ciclo de evolução, contando com as ferramentas da Biologia Molecular e da Engenharia Biomédica que permitem a caracterização genética, morfológica e bioquímica do cancer.

6.1 Estudos Futuros

Com bases nos resultados obtidos, sugerimos em investigações futuras que sejam realizados outros testes mais específicos para analisar morte celular e padronizações de potencias através de outros experimentos com outras diluições de *Viscum album*. Podendo ser realizado junto ou separadamente a outras drogas quimioterápicas e até outras homeopáticas injetáveis.

É necessário ainda realizar mais estudos com *Viscum album* provenientes de árvores diferentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AL-ACHI, A. Mistletoe (*Viscum album* L.), **US Pharm.**, v.1, p.HS12-HS18, 2005.
- ALCANTARA, P. **Espectroscopia Molecular**. Belém: Universidade Federal do Pará; Departamento de Física, p.1-5. 2002
- ALFANO, R; TATA, D; CORDERO, J; TOMASHEFSKY, P; LONGO, F; ALFANO, M. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. **IEEE J Quantum Electron**, v.20, n.12, p.1507-1511, 1984.
- BARBOSA NETO, RM. **As Bases da Homeopatia**. Campinas, 2006. Disponível em: < http://br.geocities.com/homeopatia_unicamp/biblioteca/virtual/>
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.44, p. 301-312, 2000.
- BLOSTIN, R. Role of *Viscum album* in Feline Fibrosarcoma: First Results of a French study, **Arquivos da escola de Homeopatia**, Cultura Homeopática,v.16, p.38, 2006.
- BELLAVITE, P; SIGNORINI, A. **The Emerging Science of Homeopathy**. Ed.North Atlantic Books, 2002.
- BERDEN, M.; JERMAN, I.; SJARJA, M. A possible physical basis for the healing touch evaluated by high voltage electrophotography, **Acupuntura and Eletro-Threapeutics Research**, v.22, p.127-146, 1997.
- BENET, L.Z.; CUMMINS, C.L.; WU, C.Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **Int. J. Pharm.**, v.277, p.3-9, 2004.
- BONAMIM, L V. A Homeopatia sob a nova ótica dos Novos Paradigmas da Ciência, **ANAIS DO II congresso Brasileiro de Medicina complementar**, 2002.
- BASTIDE, M. Interpretative Theories about Ultra-Dilutions.Supportivly Evidences, **Revista Cultura Homeopática**, p.22-30, 16/2006.
- BOERICKE, W. - **Materia Medica With Repertory**. Calcutá:Roy Publishing House, 1968.
- BOYLE, W.S.; SMITH, G.E. Charge coupled semiconductor devices. **Bell System Tech. J.**, v.49, p.587, 1970.
- BOIRON, J.; LUU, D; VINH, C; Etude de l'action de la chaleur sur les dilutions Hahnemaniens par spectrometrie raman.**Annales Homeopathique Française**. FR.1980

CAZACU, M., et al. The Influence of Isorel on the Advanced Colorectal Cancer. **Cancer biother. Radiopharm.**, v.18, n.1, p. 27-34, 2003.

CASTRO, L.P; COELHO, L.G. **Gastroenterologia**, Rio de Janeiro: Editora médica e Científica,2004. v.2, p.1339-1407.

CHEN, K., et al. Diagnoses of colorectal cancer using Raman Spectroscopy of laser trapped single living epithelial cells. **Opt Lett.**, v.31, n.13, p.2015-2017, 2006.

CHOI, S H.; LYU, S Y.; PARK, W B. ,Mistletoe Lectin Induces Apoptosis and Telomerase Inhibition in Human A253 Cancer Cells through Dephosphorylation of Akt, **Arch Pharm Res.**, v. 27, n. 1, p.68-76, 2004.

CHOWDARY, MVP; KALYAN KUMAR, K; THAKUR, K; ANAND, A; KURIEN, J; MURALI KRISHNA, C; MATHEW S. Discrimination of normal and malignant mucosal tissues of the colon by Raman Spectroscopy. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n.4, p.269-274, 2007.

CUNHA JR. et al. Modelo de Calibração da Concentração de Metilmetacrilato em solução aquosa utilizando Espectroscopia de absorção no Ultravioleta, **Quim.Nova**, v.26, n-6, p.850-854, 2003.

CHONG, S.; DANDO, S.; MORRISON, R. Evaluation of Biocat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. **Pharm. Res.**, v.14, p.1835-1837, 1997

DEL GIUDICE, E; PREPARATA, G. Coherente electrodynamics in water. In: SCHULTE, J.; ENDLER, P.C., (ed.). **Fundamental research in ultra high dilution and homoeopathy**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. , p. 89-103.

DEL GIUDICE, E; PREPARATA, G; VITIELLO, G. Water as a free electric dipole laser. **Phys Rev Lett.**, v.61, n.9, p.1085-8, 1988

EIZAYAGA, F. X. **Tratado de Medicina Homeopática**, 2.ed. Buenos Aires: ediciones Marecel, 1981.

FERREIRA, M.M.C.,et al. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. **Quím Nova**, v.22, n.5, p. 724-731, 1999.

FIGUEIREDO, J. **Como funciona o laser: As propriedades da luz laser e holografia**. Portugal: UALG; Dep. Física, 2006.

FONSECA, MC.M.; CASALI, V.W.D. Revisão sobre as visões química, física e Biocibernética da Homeopatia. **Revista Cultura Homeopática**, v.14, p.6-10, 2006.

GARDIN, N.E., Resposta Imunológica ao *Viscum album* em dois pacientes com doença de Hodgkin.**Revista Médico –Farmacêutica**, v.2, n.6, 1988.

GHELMAN, R. **Ação do *Viscum album* sobre a prenhez da rata albina (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia): estudo morfológico e radiológico.** 2003. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

GOETZ, P. Lês Plantes immunoestimulantes adjuvantes de la thérapie antitumorale, **J. Phytothérapie**, v.2, n. 6, p.180-182, 2004.

GOGICHADZE, G.K; MISABISHVILI, E.V; GOZICHADZE, T.G. Tumor cell formations by normal somatic cells fusing and cancer presentation prospects, **Medical Hypotheses**, v.66, p.133-136, 2006.

GUIMARÃES, Anderson Eduardo. **Utilização de Espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo (NIRS) para Detecção e Quantificação da Efedrina em Urina.** 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José Dos Campos, 2005. CD-ROM.

HAJTÓ, T. et al. Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications, **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2, n.1, p.1-9, 2005.

HANLON, E.B., et al.. Prospects for in vivo Raman spectroscopy, **Phys Med Biol**, v.45, p. R1–R59, 2000.

HELL BIOLOGSHE HEIMITTEL GmgH:Umfrage zur Verwendung von homopathischen Injektionsprapaten der Fa.Heel GmbH in der Praxis, 2000.

HOSTANSKA, K., et al. A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. **Nat Immun.**, v.15, n. 6, p.295-311, 1996-1997.

KAEGI, E. Unconventional Therapies for Cancer: 3. Iscador, **Can Med Assoc J** v.158, n.9, p.1161-1165, 1998.

KELTHER, G; FIEBIG, HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumor cell lines by mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador in vitro. **Arzneimittelforschung**, v.56, n.6, p.435-440, 2006.

KHALIL, O.S. Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements, **Clinical Chemistry**, v.45, p.165-177, 1999.

KHIL, L.Y. et al. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. **World J Gastroenterol.**, v.13, n.20, p. 2811-2818, 2007.

KRAFFT, C. Bioanalytical applications of Raman Spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v.378, p.60-62, 2003.

KOOPMAN, G. et al, In vitro effects of Viscum preparations on human fibroblasts and tumor cell lines. **Br Homoeopath.**, v.79, n.1, p.12-18, 1990.

LAFFRANCHI, A. Anthroposophical Medicine Applied to Oncology, apud **Instituto Nazionale per lo studio e la cura dei tumori**, 2005.

LEFEBVRE, G.N.F; BONAMIN, LB; OLIVEIRA, CM. Tratamento do Tumor venereo transmissível (TVT) utilizando Viscum album em associação a quimioterapia, **Revista Clínica Veterinária**, n.70, p.78-86, 2007.

LEWIS, I.R.; EDWARDS, H.G.M. **Handbook of Raman spectroscopy : from the research laboratory to the process line**. New York: Marcel Dekker, 1054p, 2001.

LIU, K. et al. Far-infrared VRT spectroscopy of two water trimer isotopomers: vibrationally averaged structures and rearrangement dynamics. **Mol Phys.**, v.89, n.5, p.1373-1396, 1996.

LOACES, D.L; LUIS, I.R; CABRERA, G.S. La Homeopatia en el tratamiento del cancer. Análisis de información, **Rev. Cubana Plant Med**, v.7, v.1, p.6-13, 2002.

LOCKIE, A; GEDDES, N. **Guia Completo de Homeopatia-Princípios e Métodos de tratamento**. São Paulo: Atica, 2001.

LOEPER, M.E. Mistletoe (Viscum album L.), The Center for Holistic Pediatric Education and Research. Disponível em: <<http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>>. Acesso em: 17 out. 2007.

LOPES, DF; CARVALHO, AC; SIBATA, MN. Estudo de casos clínicos oncológicos em caninos e felinos tratados com Homeopatia injetável (2005-2007), **PUBVET**, v.1, n.6, 2007. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=68>>.

LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; AUNER, G.; RABAH, R.; LANGERBURG, SE; KLEIN, MD, Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation : a pilot study. **Journal of Pediatric Surgery**, v.39, n-6, p.953-956, 2004.

LORD, RC; YU.; N.T. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules I. Native lysozyme and its constituent amino acids. **J. Mol Biol.**, v.50, n.2, p.509-524, 1970.

LUZ, MT. **A arte de curar versus a ciência das doenças: historia social da homeopatia no Brasil**. São Paulo: Dynamis Editorial, p.342, 1996. Disponível em Lillacs, 189565.

LO, SY; LI, W.C; HUANG, S.H. Water clusters in life. **Med Hypotheses.**, v.54, n.6, p.948-953, 2000.

LUU, D Vinh C; BOIRON, J. Etude de dilutions homéopathique par effet Raman-laser. **Ann Homeop Fr.** v.4, p.433-444, 1975

LYU, S-Y.; PARK, W-B.; Mistletoe Lectin (*Viscum album coloratum*) Modulates proliferation and Cytokine Expressions in Murine Splenocytes. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, n.6, p.662-670, 2006.

MAHADEVAN-JANSEN, A., RICHARDS-KORTUM, R., Raman Spectroscopy for the detection of cancer and precancerous. **J Biomed Opt.**, v.1, n.1, p.31-70, 1996.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiations in Ruby. **Nature**, v.187, p.493,1960.

MARTINS, A. A.; BITTAR, R. A.; NUNES, L. O; ARISAWA, E. A.; SILVEIRA JR, L. Principal Components Analysis of FT Raman Spectra of ex vivo basal cell carcinoma. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**, v.5321, n.7, p.198, 2003.

MATHER, JP; ROBERTS, PE. **Introduction to cell and tissue culture, Theory and technique**. New York: Plenum press, 1998.

MANOHARAM, R.; SHAFER, K.; PERELMAN, L.; WN, J.; CHEN, K.; DEINUM, G.; FITZMAURICE, M.; MYLES, J.; CROWE, J.; DASARI, R.R.; FELD, M.S. "Raman Spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging." *Photochem, Photobiol.* v.61, n.1, p.15-22, 1998.

MEDIO, H.O. **Veterinaria homeopatica**. Buenos Aires: Editorial Kier, 2004. p.168,170, 175.

MILGRON, LR. Patient-Practitioner-Remedy (PPR) Entanglement, Part 8: 'Laser-Like' Action of the Homeopathic Therapeutic Encounter as Predicted by a Gyroscopic Metaphor for the Vital Force. **Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd**; v.12, p.206-213, 2005 .

MOTZ, JT; FITZMAURICE, M.; MILLER, A.; GANDHI, SJ; HAKA, AS; GALINDO, LH; DASARI, RR; KRAMER, JR; FELD MS. *In vivo* Raman spectral pathology of human atherosclerosis and vulnerable plaque. **J Biomed Opt.**, v.11, n.2. p. 021003-021011, 2006.

MORGANO, MA et al., Determinação de proteína em café cru por Espectroscopia NIR e Regressão PLS, **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.1, p.25-31, jan.-mar, 2005.

NUNES, L.O; MARTIN, A.A; SILVEIRA JR, L; ZAMPIERI, M. FT-Raman Spectroscopy study for skin cancer diagnosis. **Spectroscopy Int J.**, v.17, n.2-3, p.597-602, 2003.

PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, v. 278, p.1068-1073, 1997.

PILOTTO, S; PACHECO, MTT; SILVEIRA, L; VILLAVERDE, AB; ZÂNGARO, RA. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. **Lasers Med Sci.**, v.16, n.1, p. 2-9, 2001.

PORTO, M E G. **Alterações de propriedades biológicas e físico-químicas da água induzidas por campos magnéticos.** 1998. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PORTO, M E G. Novos conceitos sobre a água e possibilidades de aplicações, **Revista Cultura Homeopática** , p.19-23, n.21, 2007.

PROFIO, A.E.; DOIRON, D.R. A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for the localization of small lung tumors. **Phys Med Biol**, v.22, n.5, p. 949-957, 1977.

QU, JNY; WILSON, BB; SURIA, D. Concentration measurements of multiple analytes in human sera by near-infrared laser Raman spectroscopy. **Appl Opt.**, v.38, n.25, p. 5491-5498, 1999.

QUIQUANDON, H. **Homeopathie Veterinaire Biotherapies.** Paris: Point Vétérinaire., 2000. 744p.

ROSENTHAL, RC. **Segredos em Oncologia veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 2004.

REUTER, A. Ameisensaure als Heilmittel und ihr Gebrauch am Krankenbett, Munchen, 1925.

ROSSIT, A; FROES, NDTC. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.10, (Figura), 2000. Disponível em: <<http://www.rsbcancer.com.br>>.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman no Infravermelho.** São Paulo: Ed. UNESP, 1996. p.13-15.

SANTOS, CHM; SILVA CN; MIJI, LNO. Adenocarcinoma de colon e Carcinoma espinocelular de canal anal concomitante. relato de caso. **Rev.Bras.Colopro.** v.25, n.2, p. 162-164, 2005.

SATHAIAH, S.; ZANGARO, RA; PACHECO, MTT. Sistema Raman para Diagnostico de Tecidos Biológicos, **Revista Univap**, v.4, n-5, p.33-34, 1996.

SAVOIE, A. et al. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. **Journal of Leucocyte Biology**, v.69, n. 68, p.845-853, 2000.

SERVAIS, PM **Larousse de la homeopatia**, México: Larousse, p.13-14, 2001

SILVEIRA JR, L; SATHAIAH, S; ZÂNGARO, RA; PACHECO, MTT; CHAVANTES, MC; PASQUALUCCI, CAG. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries, **Lasers Surg Med.**, v.30, n.4, p.290-297, 2002.

SMEKAL, A. The quantum theory of dispersion, **Naturwissenschaften**, v 11, p.873, 1923.

STOCK, W. **Homeopathic Injectables, Importance of the parenteral administration of homeopathic and athroposophic remedies**, 2002. Disponível em: <http://www.echamp.org/pdf_all/homeopathic_inject.pdf>

STONE, N; KENDALL, C; SMITH, J; CROW, P; BARR, H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussions**, v.126, p.141-157, 2004.

STAINK, D R., Principais Aspectos da cirurgia oncológica, **disciplina de clinica cirúrgica da PUCRS, p.42-48.**

SOUZA, J.; FREITAS, ZM; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção, **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.43 n.4 São Paulo oct./dic. 2007.

SUTIAK, V.; SUTIAKOVÁ, Sr, I.; SUTIAKOVÁ Jr, I. Visco Branco para equipes de pesquisa em tumores. In. I CONFERENCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Pantanal; Universidade contestado 2002. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/portugues/02pt07.pdf>

TAMIETTI, BFP. **Análise da atividade mitocondrial associada à morte celular após Terapia Fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

TEIXEIRA, M.Z. Similitude in modern pharmacology. **Br.Hom.J.** ,p.88-112, 1999.

TWARDOSWKI, J.; ANZENBACKER, P. **Raman and IR spectroscopy in Biology and Biochemistry**. New York: Ellis Horwood, 1994.

TEIXEIRA, Marcus Zulian. A similitude in modern pharmacology. **British Homeopathic Journal**,v. 88, p.112-120.1999.

VELLEMAN, S. G. Alterations in sarcomere structure, collagen organization, mitochondrial activity, and protein metabolism in the avian low score normal muscle weakness. **Dev Growth Differ.**, v. 39, n.5, p.563-570, 1997.

VOISIN, H. **Manual de Matéria Medica para o Clínico Homeopata**. São Paulo: Andrei, 1997.

YASSOYAMA, K. Estudo do Adenocarcinoma de cólon por Espectroscopia Ft-Raman. 1 CD-ROM **Dissertação (Mestrado Engenharia Biomédica)**, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José Dos Campos. CD-ROM, 2006.

ZACHARIAS, CR. Abordagens Teóricas para sistemas dinamizados: Revision de Modelos físicos. **Memórias del II Congreso Latinoamericano de Ingenieria Biomédica**, Cuba/Havana, 2001.

ANEXO A

1) Fundamentos da Homeopatia

A homeopatia já era praticada na antiguidade em 460-437 a.C por Hipócrates, médico grego, que se baseava na observação da natureza e acreditava na existência da força Vital. Posteriormente Paracelso em 1493-1541 d.C, cria a Teoria das Assinaturas, administrando substâncias da natureza (aspecto, cor, forma, odor e sabor da substância) que se assemelham a sintomas e aos órgãos doentes, por ex. a Flor de Eufrásia que tinha o formato da Íris, portanto poderia ser recomendada nos tratamentos oculares (Barbosa Neto, 2006).

A Homeopatia, palavra greco-latina que significa Homoiós semelhante e pathos sofrimento/doença (SERVAIS, 2001; LOACES; LUIS; CABRERA, 2002), é uma especialidade Médica, Veterinária, Farmacêutica e Odontológica, que apesar dos 200 anos de experiência clínica e resultados expressivos, continua sendo um grande desafio a comunidade científica em função da insuficiência de informações que caracterizam os fenômenos, que ao longo de sua existência são cada vez mais verificados e observados, porém inexplicáveis, pelo menos através do contexto científico ortodoxo (FONSECA; CASALI, 2006). Seu mais importante precursor Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843), um médico alemão decepcionado com a medicina exercida em sua era, baseada em sangrias, purgantes e uso de sanguessugas foi considerada por ele arcaica, estimulando-o a se empenhar em estudar a respeito da *Cinchona officinalis*, a Quina, surgindo o primeiro fundamento da Homeopatia, a experimentação *in vivo* (SERVAIS, 2001).

Em seu contexto epistemológico, a homeopatia se fundamenta em princípios distintos da medicina convencional, aplicando o princípio de cura pela similitude, por meio de substâncias previamente experimentadas em indivíduos sadios e em doses infinitesimais. Na aplicação terapêutica desses pressupostos, valoriza a individualidade humana, elegendo dentre as milhares de substâncias

experimentadas, aquela que engloba a totalidade de sintomas característicos de cada paciente (nos aspectos psíquicos, emocionais, gerais e clínicos), empregando para um mesmo tipo de doença, medicamentos distintos para cada indivíduo enfermo (ZULIAN, 1999). Causa estranheza ao modelo farmacológico dose-dependente que substâncias diluídas e agitadas repetidamente (dinamizadas), em concentrações inferiores ao número de Avogadro ($10^{-23}M$), possam despertar alguma resposta em sistemas biológicos ou seres vivos, sendo este o principal alvo das críticas ao modelo homeopático (ZULIAN, 1999).

Buscando uma explicação racional e científica para o fenômeno da transmissão da "informação" dos efeitos primários das substâncias através das ultradiluições homeopáticas, encontramos algumas hipóteses fundamentadas em modelos físico-químicos. Discorrendo sobre a "teoria da memória da água", citamos as pesquisas do grupo de Emiliano Del Giudice, do Departamento de Física Nuclear da Universidade de Milão, que estuda as modificações de natureza eletromagnética da água pela "teoria quântica da super-radiância". Segundo a eletrodinâmica quântica, a matéria não representa um aglomerado inerte de moléculas e sim um meio dinâmico, capaz de selecionar e catalisar as reações moleculares de acordo com os diversos campos eletromagnéticos que ocorrem no seu interior. Por meio de modelos matemáticos, os autores especulam que o campo eletromagnético de uma substância em solução pode gerar certos "domínios de coerência" no solvente, específicos e estáveis, como uma "assinatura eletromagnética da substância na água". Dessa forma, a organização da água seria um processo dinâmico e coerente, associado a interações eletromagnéticas, de longo alcance e baixíssima intensidade (DEL GUIDICE, 1998). A presença dos campos eletromagnéticos sugerido por PORTO, 2007, relata que a presença da água diluída e dinamizada pode ser o veículo informacional a qual devemos estudar. Neste experimento utilizando o UltraVioleta, foi detectado pelo espectrômetro a absorção e uma luz na faixa em que o soluto não poderia mais ser detectado, porém o solvente emitiu uma luz atribuída aos arranjos moleculares da água. Concluindo que os campos eletromagnéticos e a

dinamização aquosa induzem a formação de propriedades na água e não dependem do soluto.

A teoria dos significados corporais descrita por Lagache, baseia-se na comunicação informacional do corpo, onde o organismo complexo estruturalmente faz intercâmbios de informação com o mundo exterior e vice-versa, de forma não verbal, onde a energia se faz presente nesta troca, gerando ressonância que pode utilizar as ondas eletromagnéticas como veículo da informação. Para isto retornamos aos conceitos farmacológicos tradicionais de chave e fechadura (receptor sensível) que vai processar e tratar as informações que tiverem significado para o organismo (BASTIDE, 2006).

A probabilidade pequena da conservação dos princípios ativos atribuída à grande parte das preparações homeopáticas, onde confere a este método terapêutico muitas controvérsias quanto à sua eficácia gerando dúvidas de propriedades medicamentosas ou placebo. Foram realizados vários trabalhos experimentais demonstrando a existência de efeitos biológicos (não-placebo) dos medicamentos homeopáticos. Porém, a simples constatação de tais resultados não minimiza o principal entrave de sua aceitação científica, que é a incompatibilidade com as bases filosóficas da ciência tradicional, representadas pelo paradigma cartesiano - mecanicista. Por este motivo, o objetivo desta revisão realizada por BONAMIN, 2002 é apresentar algumas propostas teóricas não mecanicistas da ciência contemporânea (p.e. teoria do caos e dos sistemas complexos) aplicadas à compreensão do fenômeno homeopático, possibilitando uma nova reflexão a respeito da validade ou não de tais medicamentos, enquanto abordagem clínica e científica. Conclui-se que, sob a luz das novas teorias da ciência, o uso e a eficácia de remédios homeopáticos na clínica médica torna-se plausível e cientificamente aceitável.

2) A Homeopatia no Brasil

1840 chega ao Brasil o medico francês Jules Benoit Mure discípulo de Hahnemann, sendo o principal divulgador da pratica da Homeopatia.

1844- foi prontamente apoiado por D.Pedro II a fundar a 1ª Escola de Homeopatia no Rio de Janeiro;

1895-Avanço da Homeopatia através dos centros espíritas com Dr.Adolfo Bezerra de Menezes;

1920-Dr. Nilo Cairo escreve uma obra importante e mais lida até hoje e surge Dr.Cláudio Real, o 1º veterinário a realizar pesquisas clinicas;

1936-Fundação da APH destaca-se uma brilhante aluna a Dra.Anna Kossaki-Romanach que escreve o livro Homeopatia em 1000 conceitos;

1975- forma-se o 1º medico homeopata Dr.Izao Carneiro Soares pela Faculdade de Medicina da Santa Casa e fundação da 1ª Farmácia Homeopática em Ribeirão Preto por sua esposa a Dra.Maria Lucia Soares, farmacêutica homeopata;

1979 - Presidente Figueiredo reconhece a Homeopatia como especialidade médica juntamente com Conselho Federal de Medicina;

13/12/1981- Fundação do Instituto Homeopático François Lamasson é uma sociedade civil, de caráter científico cultural, com duração por tempo indeterminado, sem fins lucrativos, reconhecido de utilidade pública municipal pela lei: 5060 de 08/06/1987 e que objetiva congregar homeopatas para atender as suas finalidades;

1996-Fundação da Amhvesp tem como presidente a Dra.Maria do Carmo Arenales;

2002- a brasileira Profa. Dra.Leoni Villano Bonanin preside o mais importante Comitê de Pesquisas Internacionais o GIRI- Groupe International de Recherche sur l'Infinitesimal, sustentado a Teoria dos Significados Corporais de Agnés Lagache e

Madeleine Bastide, cuja principal linha de pesquisa é desenvolver Modelos experimentais para o estudo de Ultra diluições (BARBOSA NETO, 2006);

2003- Dr. Ricardo Ghelman (USP) publica da 1ª Tese de doutorado que pesquisou a toxicidade do *Viscum album* em ratas prenhes;

2007- São realizados os primeiros estudos clínicos com *Viscum album* da Injectcenter em cães e gatos;

O Brasil é um dos países com maior número de homeopatas no mundo, em qualidade e quantidade;

3) Farmacologia Homeopática

As Farmacopéias Homeopáticas oral e injetável são distintas, porem a Lei da semelhança é sua especificidade, pois é formado por um sistema com leis e princípios próprios (LOACES; LUIS; CABRERA, 2002). A preparação dos homeopáticos injetáveis segue a Farmacopéia Homeopática Brasileira, onde o extrato das plantas é adquirido a 10% em meio à solução hidroalcolica e são diluídos e dinamizados utilizando a técnica Decimal Hering (1/10) e, portanto os injetáveis homeopáticos são destinados a uso parenteral (Subcutâneo, Intramuscular e Intravenoso) o veículo utilizado é solução isotônica de Cloreto de sódio a 0,9%. Os medicamentos homeopáticos orais são preparados de acordo com as Farmacopéias Homeopáticas Alemã, Francesa e a Brasileira onde temos basicamente 3 técnicas diferentes de preparação:

1ª Técnica dos Frascos Separados

-Decimal Hering (1/10), onde se coloca em um recipiente com 9 gotas de solução hidroalcoólica 1 gota da droga ou soluto.

-A Centesimal Hahnemaniana (1/100) onde se coloca 1 gota da droga ou soluto em 99 gotas de solução hidroalcoólica.

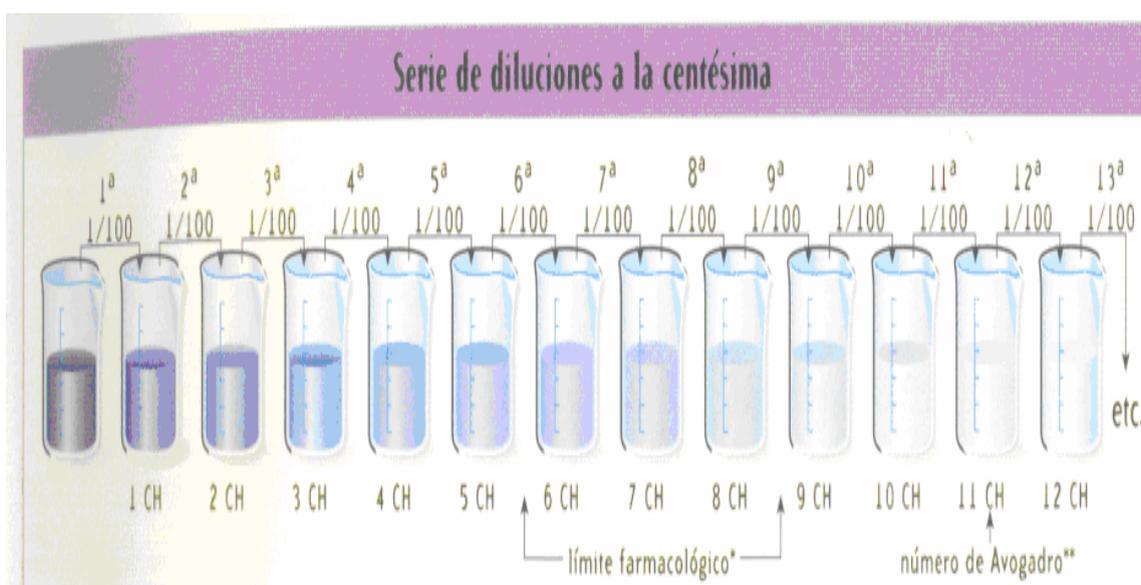


Figura 13: Série de Diluições da Centesimal Hahnemaniana (CH), de acordo com a Farmacopéia Homeopática Alemã e Francesa .
 Fonte: (LOCKIE, 2003).

2ª Técnica-Fluxo descontínuo ou Frasco único

- Método Korsakov que consiste em agregar 1 gota da droga a 99 gotas do solvente, homogeneizar bem, termos a 1ª CH (1% insumo ou 10^{-2}), em seguida desprezar o líquido e acrescentar 99 gotas do soluto, termos a 2ª CH, pois forma-se uma mescla de película nos bordos do frasco que atuarão.

3ª Técnica do Fluxo Contínuo

- Dinamizadores contínuos (aparelhos) começam a produção da 30ª CH em diante, através de uma passagem contínua de solvente que agita violentamente a droga.

A figura 14 mostra a preparação dos medicamentos homeopáticos em escala industrial .

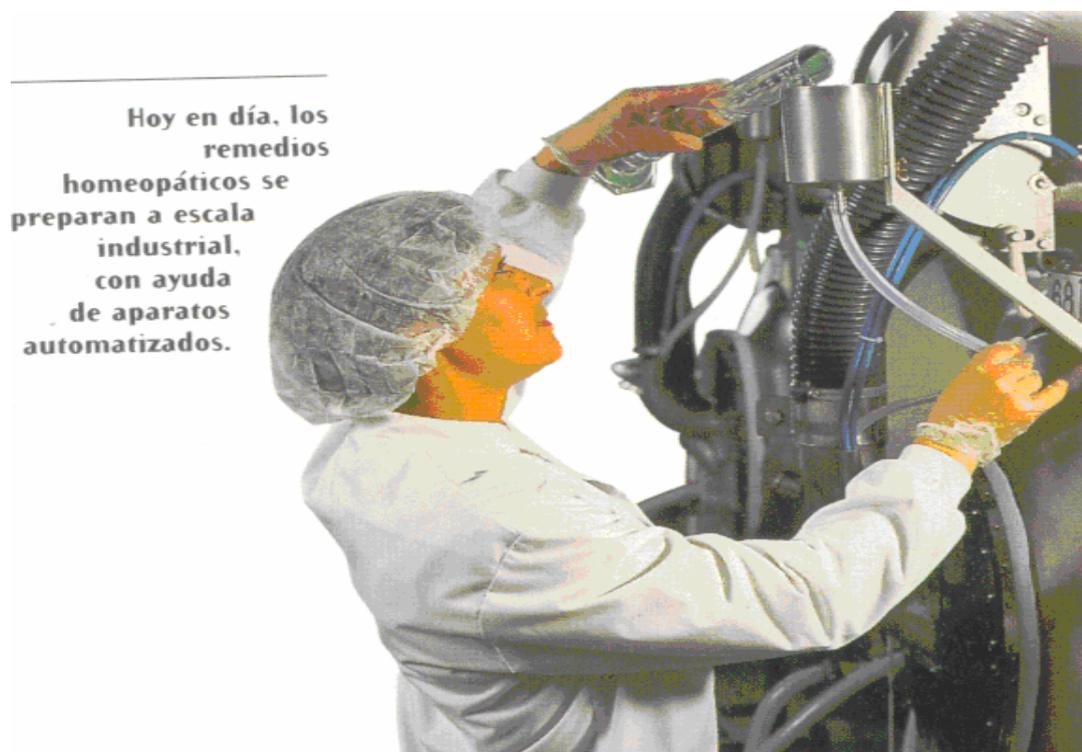


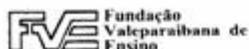
Figura 14: Dinamizador de Fluxo Contínuo.
Fonte: (SERVAIS, 2006)

A figura 15 demonstra as ampolas homeopáticas em sua apresentação final ao consumidor.



Figura 15: Ampolas Estéreis de Homeopáticos (Injectcenter)

ANEXO B: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



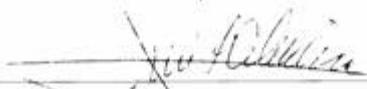
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A051/CEP/2007, sobre *“Eficiência do Viscum album em células caco-2 in vitro e in vivo monitorado por espectroscopia raman no infravermelho próximo”* sob a responsabilidade de *Cristina Pacheco Soares*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 19 de abril de 2007



PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap