



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e Avaliação *In Vitro* de Bioterápicos de
Candida albicans

Fortune Homsani

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma
Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro
2013

FORTUNE HOMSANI

**Desenvolvimento e Avaliação *In Vitro* de Bioterápicos de
*Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro

2013

H768d

Homsani, Fortune.

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de Bioterápicos de *Candida albicans*/ Fortune Homsani; orientadores, Carla Holandino Quaresma, André Luis Souza dos Santos. - Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

xviii,107f. : il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1.Infecções fúngicas. 2.C.albicans. 3. Bioterápicos. 4.protocolo Roberto Costa. 5. Homeopatia. I. Quaresma, Carla Holandino. II. Santos, André Luis Souza dos.

CDD 616.969

FORTUNE HOMSANI

Desenvolvimento e Avaliação *In Vitro* de Bioterápicos de *Candida albicans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – UFRJ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Lucimar Ferreira Kneipp
Instituto Osvaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Silvana Marques da Silva
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Jaeger de Carvalho
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Leitão
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Mirian Ribeiro Leite Moura
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Cesar A. Antunes Teixeira
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Ao meu esposo Nilton, pelo amor e incentivo.

Ao meu filho Rômulo por seu carinho e compreensão.

Aos meus pais Sarah e Alberto (in memoriam) pela minha existência.

AGRADECIMENTOS

A D'us, por sempre estar ao meu lado me dando a certeza de sua existência.

À vida pelas oportunidades proporcionadas que me trazem o prazer de despertar todos os dias.

*À Prof^a. Dr^a. **Carla Holandino**, orientadora deste trabalho e exemplo de mestre, que sempre acreditou e me incentivou a seguir adiante, me conduzindo a serenidade quando necessário. Obrigada amiga, por ter me proporcionado a oportunidade de me dedicar mais a homeopatia e fazer parte desta família tão especial que é o Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, carinhosamente: "Lab. Cholandino".*

*Ao Prof. Dr. **André Luís Souza dos Santos**, orientador deste trabalho, por aceitar o desafio, por suas valiosas contribuições e por ter me oferecido condições de realizar este estudo. Obrigada, você é um exemplo de dedicação e espírito agregador.*

*À minha mãe, **Sarah**, que sempre foi um exemplo de determinação. Obrigada pelo seu carinho e apoio nas horas necessárias. Muito me orgulha ser um fruto seu.*

*Ao meu esposo, **Nilton**, pelo amor, compreensão, incentivo e capacidade de sempre me surpreender, me conquistando todos os dias.*

*Ao **Rômulo**, meu filho, o amor incondicional da minha vida. Obrigada pelo seu carinho, confiança, respeito e amizade. Obrigada por ser meu filho!*

*Ao meu irmão **Cezar Alberto**, e meus sobrinhos **Cynthya**, **Yashmín** e **Yurí** por estarmos sempre juntos apoiando uns aos outros, compartilhando todos os momentos de nossas vidas.*

A todos meus familiares, tios, tias, primos e primas, pela união e afeto que transcendem laços sanguíneos.

À *Cecy*, minha sogra pela torcida e amizade sempre demonstradas. Você aos 88 anos é para mim um exemplo de vitalidade, respeito e amor pela vida.

Ao *Venício da Veiga*, pela amizade e por seu talento na área de microscopia, me orientando nesta tarefa.

À *Gleyce Moreno* pela “força” e por compartilhar de forma paciente seus conhecimentos. Obrigada por nossas conversas sobre os mais variados temas e por sua amizade.

Ao amigo, *Cesar Augusto*, pela sua disponibilidade em abordar os diversos temas e discutir resultados, sempre com muito entusiasmo conduzindo à reflexão.

À amiga *Camila Siqueira*, pelo agradável convívio que permeou da seriedade dos estudos à descontração de nossas vidas, me permitindo compartilhar cada ultrassonografia até a chegada da *Júlia*, sua primeira filha.

Aos amigos do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas: *Alexandre Carnevalle*, *Ana Paula Matos*, *Beatriz Costa*, *Felipe Alves*, *Fernanda Aguiar*, *Francielle Capella*, *Lucas Fernandes*, *Thaís Menezes*, pelo agradável convívio, pelo carinho, respeito, companheirismo e amizade.

Aos professores do Laboratório de Micologia Clínica *Paulo Neufeld* e *Luiz Henrique dos Santos* pela orientação e disponibilidade, proporcionando as condições necessárias para a identificação do agente etiológico do bioterápico deste estudo.

À Prof^ª. Dr^ª. *Tatiana El-Bachá* pela orientação, colaboração e disponibilização da estrutura do Laboratório de Bioquímica de Vírus para a realização dos experimentos de respiração celular de alta resolução.

À *Juliana Grechi* por sua orientação nos trabalhos com macrófagos RAW-264-7.

*À banca de acompanhamento, Prof^a. Dr^a. **Marta Helena Branquinha** e Prof^a. Dr^a. **Sheila Garcia**, pelas importantes contribuições durante este trabalho.*

*A todos os amigos que tanto me incentivaram e me apoiaram para a conclusão deste trabalho em especial: **Elizabeth Kós, Teraza Leitão, Juliana Patrão** e **Wellington Oliveira**. Obrigada pelo carinho e torcida de vocês.*

Aos professores que gentilmente aceitaram o convite de compor a banca examinadora desta dissertação.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, carinho e respeito.

“Somos todos anjos com uma asa só;
e só podemos voar quando abraçados uns aos outros.”

(Luciano de Crescenzo)

RESUMO

HOMSANI, Fortune. **Desenvolvimento e Avaliação *In Vitro* de Bioterápico de *Candida albicans***. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O gênero *Candida spp* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados, especialmente em doentes graves e em imunocomprometidos, com predominância da *Candida albicans*. A espécie *C. albicans* é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico; entretanto, casos de resistência adquirida a antifúngicos clássicos têm sido relatados. O aparecimento de efeitos tóxicos e o alto custo destes medicamentos torna desejável à busca por novas estratégias terapêuticas, dentre estas a pesquisa e o emprego de formulações homeopáticas para o tratamento de infecções fúngicas. Os bioterápicos são medicamentos preparados a partir de produtos biológicos, conforme a Farmacopeia Homeopática Brasileira, indicados para tratamento de infecções de etiologia conhecida. A proposta deste estudo foi o desenvolvimento e a avaliação *in vitro* de bioterápicos de *C. albicans* preparados a partir de adaptações no protocolo Roberto Costa. Os bioterápicos de *C. albicans* foram preparados nas potências 12DH (BIO 12DH) e 30DH (BIO 30DH) conforme técnica desenvolvida pelo médico brasileiro Roberto Costa, após prévia identificação do agente etiológico. A manipulação dos bioterápicos envolveu o uso de dois solventes: água destilada estéril e tampão salina fosfato (PBS). A análise da ultraestrutura fúngica por microscopia eletrônica de transmissão, seguida da avaliação da capacidade de formação de colônias, indicou que ambos os aspectos biológicos não foram modificados após a diluição da suspensão de leveduras (10^7 leveduras/ml) em água ou em PBS. Os estudos por espectrofotometria no UV visível (530 nm) e por citometria de fluxo indicaram que BIO 12DH e BIO 30DH são isentos de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, e de leveduras de *C. albicans*. Os parâmetros físico-químicos de condutividade elétrica e pH de BIO 12DH e BIO 30DH apresentaram aumento em seus valores absolutos quando comparados ao controle água destilada estéril. Adicionalmente, verificamos que BIO 12DH e BIO 30DH são isentos de citotoxicidade. O índice de adesão de *C. albicans* frente às células MA104 pré-tratadas por BIO 12DH e BIO 30DH, em diferentes situações

experimentais, foi estatisticamente diminuído ($p < 0,05$) indicando que o pré-tratamento altera um importante fator de virulência *C. albicans*. A função respiratória avaliada por respirometria de alta resolução indicou uma redução de 5% na capacidade máxima respiratória, decorrente do tratamento com BIO 30DH, enquanto o tratamento com BIO 12DH diminuiu em 15% a respiração de rotina e a capacidade máxima respiratória das células MA104. Entretanto, nenhuma alteração na produção de óxido nítrico, nem tão pouco na atividade mitocondrial, foi detectada quando macrófagos RAW 264-7 foram tratados por 2 dias com BIO 30DH. Os resultados obtidos indicam que as adaptações feitas no protocolo Roberto Costa permitem o preparo de bioterápicos de *C. albicans* isentos de citotoxicidade e capazes de modificar importantes parâmetros de *C. albicans* e de células MA104. Este estudo traz perspectivas promissoras acerca do potencial antifúngico de formulações homeopáticas.

Palavras-chave: infecções fúngicas, *C. albicans*, bioterápicos, protocolo Roberto Costa, homeopatia.

ABSTRACT

HOMSANI, Fortune. ***In vitro* Development and Evaluation of *Candida albicans* Biotherapeutic Medicines**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Candida spp genus is responsible for about 80% of fungal infections in the hospital environment, accounting for most systemic infections in hospitalized patients. *Candida albicans* species is the etiologic agent involved with infections affecting mainly the severe and the immunocompromized patients. This species is naturally sensitive to all systemic antifungal drugs; however, resistance to these classic medicines has been reported. The appearance of toxic effects and the high cost of these medications make the search for new therapeutic strategies desirable for the treatment of fungal infections, including the research and employment of homeopathic formulations. Biotherapeutic medications are compounded from biologic products, following the Brazilian Homeopathic Pharmacopeia, and indicated for treatment of known etiologic infections. The proposal of this study was to develop and evaluate *C. albicans* biotherapeutic medications *in vitro*. These biotherapeutics were prepared in the 12DH (BIO 12DH) and 30DH (BIO 30DH) potencies, following Roberto Costa's protocol with some adaptations. Two solvents were employed in the compounding: distilled water and phosphate buffer saline (PBS). Analysis of fungal ultrastructure through transmission electron microscopy, followed by an evaluation of colony formation capability showed that both biological aspects were not modified after dilution of yeast suspension (10^7 yeast/ml) in water or PBS. UV – visible spectrophotometry (530 nm) and flow cytometry studies indicated that BIO 12DH and BIO 30DH did not present macromolecules, such as proteins or nucleic acids, or *C. albicans* yeasts. The physical-chemical parameters of pH and electrical conductivity obtained from BIO 12DH and BIO 30DH presented an increase in their absolute values when compared to the distilled sterile water control. Additionally, we verified that BIO 12DH and BIO 30DH did not present cytotoxicity. Adhesion rate of *C. albicans* on pre-treated MA104 cells, in different experimental situations, showed a statistically significant decrease ($p < 0.05$), indicating that pre-treatment modifies an important virulence factor of *C. albicans*. The respiratory function evaluated by high

resolution respirometry indicated a 5% reduction in the maximum respiratory capacity induced by BIO 30DH treatment, whereas a 15% decrease in routine respiration and maximum respiratory capacity was detected when MA104 cells were treated with BIO 12DH. However, no alteration in the nitric oxide production or in the mitochondrial activity was detected when RAW 264-7 macrophages were treated for 2 days with BIO 30DH. The results suggested that an adapted model of Roberto Costa's protocol permitted the compounding a biotherapeutic from *C. albicans* free from cytotoxicity and capable to modify important cellular parameters of *C. albicans* and MA104. This work brings promising perspectives in the field of homeopathic formulations for antifungal use.

Keywords: fungal infections, *C. albicans*, biotherapeutics, Roberto Costa's protocol, homeopathy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gemulação ou brotamento, processo reprodutivo das leveduras de <i>Candida albicans</i> .	27
Figura 2.	Diferentes morfologias de <i>C. albicans</i> .	28
Figura 3.	Esquema do preparo do bioterápico de <i>C. albicans</i> .	52
Figura 4.	Esquema do preparo das grades de cobre revestida com filme de parlódio/carbono para avaliação morfológica de leveduras de <i>C. albicans</i> , por contrastação negativa.	54
Figura 5.	Placas representativas da cultura de bioterápicos em meio <i>Candida</i> CHROMagar®.	65
Figura 6.	Imagens de leveduras de <i>C. albicans</i> em PBS e em água destilada, por contrastação negativa.	66
Figura 7.	Imagens de leveduras de <i>C. albicans</i> 1, 2 3DH em água destilada estéril, por contrastação negativa.	66
Figura 8.	Imagens de leveduras de <i>C. albicans</i> 1DH em álcool 77% (V/V), por contrastação negativa.	66
Figura 9.	Micrografias obtidas por MET de leveduras de <i>C. albicans</i> em água dinamizada e não dinamizada.	67
Figura 10.	Micrografias obtidas por MET de leveduras de <i>C. albicans</i> em álcool 77% (V/V) dinamizada e não dinamizada.	67
Figura 11.	Imagens das placas de cultura <i>C. albicans</i> 1DH a 6DH, nos solventes álcool 77% (V/V) e água destilada.	69
Figura 12.	Determinação da absorbância das soluções dinamizadas de <i>C. albicans</i> .	71
Figura 13.	Quantificação de leveduras/ml nas soluções dinamizadas de <i>C. albicans</i> , por citometria de fluxo.	72
Figura 14.	Avaliação da CMI de Anfotericina B frente à leveduras de <i>C. albicans</i>	73
Figura 15.	Viabilidade de leveduras de <i>C. albicans</i> frente às diferentes situações experimentais, avaliação por UFC.	74
Figura 16.	Citometria de fluxo de suspensão de leveduras de <i>C. albicans</i> incubadas por 48 horas, a 37°C com diferentes concentrações de água, água 30DH, BIO 12DH e BIO 30DH.	75
Figura 17.	Leveduras de <i>C. albicans</i> incubadas por 48 horas, a 37°C com diferentes concentrações de BIO 12DH e BIO 30DH, por citometria de fluxo.	76

Figura 18.	Avaliação da viabilidade de leveduras de <i>C. albicans</i> tratadas com o bioterápico BIO 12DH na concentração de 10%, em doses fracionadas por citometria de fluxo.	77
Figura 19	Avaliação da viabilidade de leveduras de <i>C. albicans</i> tratadas com o bioterápico BIO 30DH na concentração de 10%, em doses fracionadas, por citometria de fluxo.	78
Figura 20	Viabilidade de células epiteliais MA104 tratadas com o BIO 12DH por MTT.	79
Figura 21.	Viabilidade de células epiteliais MA104 tratadas com o BIO 30DH por MTT.	79
Figura 22.	Índice de adesão de leveduras de <i>C. albicans</i> às células epiteliais MA104 tratadas por 18 dias com BIO 12DH e BIO 30DH.	81
Figura 23.	Índice de adesão de leveduras de <i>C. albicans</i> às células epiteliais MA104 tratadas por 1 dia com BIO 12DH e BIO 30DH.	82
Figura 24.	Índice de adesão de leveduras de <i>C. albicans</i> às células epiteliais MA104 tratadas por 40 dias com BIO 30DH.	82
Figura 25.	Índices respiratórios de células MA104 tratada com 6 alíquotas de BIO 30DH, distribuídas em 2 dias.	84
Figura 26.	Índices respiratórios de células MA104 tratadas com 18 alíquotas de BIO 12DH, BIO 30DH e água 30DH, distribuídas em 4 dias.	85
Figura 27.	Avaliação da atividade mitocondrial de macrófagos RAW 264-7 tratados por 48 horas BIO 30DH, por MTT.	86
Figura 28.	Análise da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264-7 tratados por 48 horas com BIO 30DH.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Soluções analisadas, solventes e diluições utilizadas.	56
Tabela 2.	Quantificação de UFC nas diluições plaqueadas dos bioterápicos.	68
Tabela 3.	Valores das leituras de condutividade e pH das várias amostras.	70
Tabela 4.	Número de doses e tempo de tratamento das leveduras com os bioterápicos.	77
Tabela 5.	Média de fluorescência determinada por citometria de fluxo para Índice de adesão <i>C. albicans</i> às células MA104.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC[®]: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosina trifosfato

BDA: Meio de batata, dextrose e agar

BHI: Infusão cérebro-coração

BSA: Albumina de soro bovino

CE: Corrente Elétrica

CFF: Conselho Federal de Farmácia

CH: Centesimal Hahnemanniana

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CIM: Concentração inibitória mínima

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DH: Decimal de Hering

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DST: Doença Sexualmente Transmitida

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ETS: Sistema de transporte de elétrons

FCCP: fluorocarbonil-cianeto fenilidrazona

FHB: Farmacopéia Homeopática Brasileira

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

GSH: L-gama-glutamil-L-cisteína-glicina

HEPES: N-(-2-hidroxietil)piperazina-N'-(2—ácido etanosulfônico)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

LM: Cinquentamillesimal

LPS: Lipopolissacarídeo

MDCK : *Mardin-Darby canine kidney*

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MS: Ministério da Saúde

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ON: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão salina fosfato

PI: Iodeto de propídio

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RC: Roberto Costa

SAP: Aspártico peptidase secretadas

SFB: Soro fetal bovino

SUS: Sistema Único de Saúde

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV: Ultra-violeta

YCB: Base de carbono para levedura

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%: Percentual

§: Parágrafo

µg: Micrograma(s)

µl: Microlitro(s)

µm: Micrômetro(s)

µM: Micromolar

µS/cm: Microsimens por centímetro (unidade de condutividade elétrica)

CO₂: Dióxido de carbono

g: Grama (s)

h: hora(s)

H₃PO₄: Ácido fosfórico

KCl: Cloreto de potássio

KCN: Cianeto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

M: Molar

min: Minuto(s)

ml: Mililitro(s)

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico

NaCl: Cloreto de sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sódio

ng: Nanograma(s)

nm: Nanômetro(s)

°C: Graus Celsius

rpm: Rotação por minutos

(V/V): volume (ml) / volume (ml)

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1. Infecções Fúngicas	23
1.2. Candidíase e <i>Candida albicans</i>	24
1.2.1. Candidíase	24
1.2.2. <i>Candida albicans</i>	27
1.2.2.1. Fatores de Virulência de <i>Candida albicans</i>	29
1.3. Tratamento das Infecções Causadas por <i>Candida albicans</i>	30
1.3.1. Antifúngicos Clássicos e <i>Candida albicans</i>	30
1.3.2. Terapias Complementares e as Infecções Fúngicas	32
1.3.2.1. A Homeopatia	34
1.4. A Terapêutica Homeopática	38
1.4.1. O Princípio da Semelhança	38
1.4.2. O Princípio da Experimentação no Homem Sadio	39
1.4.3. Doses Mínimas	39
1.4.4. Medicamento Único	40
1.5. Medicamentos Homeopáticos	40
1.5.1. Origem dos Medicamentos Homeopáticos	41
1.5.2. Bioterápicos	41
1.5.3. Bioterápicos Roberto Costa (RC)	42
1.6. Pesquisa Científica e Homeopatia	43
2. Objetivos	46
2.1. Objetivo Geral	46
2.2. Objetivos Específicos	46
3. Material e Métodos	47
3.1. Material	47
3.1.1. Equipamentos e Utensílios	47
3.1.2. Reagentes	48
3.2. Métodos	49
3.2.1. Preparo de Soluções	49
3.2.1.1. Meio de YCB	49

3.2.1.2.	Meio de Solução de Soro Albumina Bovina	49
3.2.1.3.	Meio Ágar Batata	49
3.2.1.4.	Meio Ágar Nutriente	49
3.2.1.5.	Meio de Cultura DMEM	50
3.2.1.6.	Tampão Salina Fosfato (PBS)	50
3.2.1.7.	Tripsina	50
3.3.	Suspensões Celulares Utilizadas	51
3.3.1.	Suspensão de <i>Candida albicans</i>	51
3.3.2.	Cultura de Células Epiteliais de Rim de Macaco (MA104)	51
3.3.3.	Cultura de Células de Macrófagos da Linhagem RAW 264-7	51
3.4.	Preparo dos Bioterápicos de <i>Candida albicans</i>	51
3.5.	Identificação das Leveduras Utilizadas para o Preparo dos Bioterápicos	52
3.5.1.	Identificação Através da Utilização do CHROMagar®	52
3.5.2.	Diferenciação entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	53
3.6.	Avaliação dos Efeitos dos Solventes na Morfologia e Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e na Capacidade de Formação de Colônias de <i>C. albicans</i>	53
3.6.1.	Avaliação Morfológica Por Contrastação Negativa	53
3.6.2.	Avaliação de Ultraestrutura Celular	54
3.6.3.	Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	55
3.7.	Análises Físico-Químicas das Preparações Farmacêuticas	56
3.8.	Quantificação da Presença de Leveduras de <i>C. albicans</i> nas Várias Diluições Homeopáticas do Bioterápico	56
3.8.1.	Espectrofotometria no Ultravioleta Visível	56
3.8.2.	Citometria de Fluxo	57
3.9.	Citotoxicidade do Bioterápico Frente às Leveduras de <i>C. albicans</i> e Células Epiteliais MA104	57
3.9.1.	Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Leveduras de <i>C. albicans</i>	57
3.9.1.1.	Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias	57
3.9.1.2.	Avaliação da Citotoxicidade dos Bioterápicos por Citometria de Fluxo	58

3.9.2. Avaliação da Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Células MA104	59
3.10. Quantificação do Índice de Adesão de <i>Candida albicans</i> às Células MA104	60
3.11. Respirometria de Alta Resolução de Células Epiteliais MA104	61
3.12. Efeito dos Bioterápicos Sobre os Macrófagos RAW 264-7	62
3.12.1. Citotoxicidade Frente às Células RAW 264-7	62
3.12.2. Dosagem de Óxido Nítrico Produzido por Macrófagos RAW 264-7	62
3.13. Análise Estatística	63
4. Resultados	64
4.1. Bioterápicos de <i>Candida albicans</i>	64
4.1.1. Identificação das Leveduras de <i>C. albicans</i>	64
4.1.1.1. Através do Uso do CHROMagar®	64
4.1.1.2. Diferenciação entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> das Colônias Formadas no CHROMagar®	65
4.2. Efeito dos Solventes na Morfologia, Ultraestrutura e Capacidade de Colônias de <i>C. albicans</i>	65
4.2.1. Avaliação Morfológica pelo Método de Contrastação Negativa	65
4.2.2. Análise da Ultraestrutura Celular	66
4.2.3. Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias	68
4.3. Análises Físico-Químicas dos Bioterápicos	69
4.4. Quantificação da Presença de Leveduras de <i>C. albicans</i> nas Diluições Homeopáticas dos Bioterápicos	70
4.4.1. Espectrofotometria no Ultravioleta Visível	70
4.4.2. Citometria de Fluxo das Soluções Dinamizadas	71
4.5. Citotoxicidade dos Bioterápicos	72
4.5.1. Frente às Leveduras de <i>C. albicans</i>	72
4.5.1.1. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias	72
4.5.1.2. Viabilidade Celular Avaliada por Citometria de Fluxo em Variadas Concentrações dos Bioterápicos	74

4.5.1.3. Viabilidade da <i>C. albicans</i> após Incubação com Doses Fracionadas dos Bioterápicos	76
4.5.2. Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Células Epiteliais MA104	78
4.6. Índice de Adesão de <i>C. albicans</i> às Células MA104	79
4.7. Efeito do Bioterápico na Respiração Celular da MA104	83
4.8. Efeito dos Bioterápicos sobre Macrófagos RAW 264-7	85
4.8.1. Ensaio de Citotoxicidade	85
4.8.2. Análise da Produção de Óxido Nítrico	86
5. Discussão	88
6. Conclusões	95
7. Perspectivas	97
8. Referências Bibliográficas	98

1. Introdução

1.1. Infecções Fúngicas

Fungos são organismos eucariotos pertencentes ao reino *Fungi*, podendo ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares, dotados de parede e membrana celular (BARON, 1996). Algumas espécies dos gêneros, como por exemplo, *Aspergillus* e *Cryptococcus*, são patogênicas ao homem, enquanto outras como por exemplo, dos gêneros *Candida* e *Malassezia*, fazem parte da microbiota da pele, do trato genital, gastrointestinal e oral, podendo causar infecções oportunistas com risco de evolução para infecções sistêmicas denominadas fungemias, especialmente em indivíduos imunodeprimidos (PRATES, 2010).

As doenças causadas por fungos começaram a ganhar notoriedade a partir das observações feitas pelo cientista Agostino Bassi no início do século XIX, tendo o mesmo realizado inúmeros ensaios que o consagraram como o “Pai da Micologia” (COLOMBO *et al.*, 2007). Porém a micologia viveu um período de ostracismo, vindo a ressurgir como uma importante área médica a partir das décadas de 70 e 80 do século passado (GIOLO, 2010).

A incidência de infecções causadas por fungos apresentou considerável crescimento nos últimos anos devido ao aumento do uso de drogas antineoplásicas e imunossupressoras, antibióticos de largo espectro, implantação de dispositivos protéticos e enxertos. Pacientes queimados, com pancreatite, portadores de neutropenia ou AIDS, assim como pacientes com longo tempo de internação, também possuem uma maior predisposição para contrair infecções por fungos (PRATES, 2010).

Estima-se em 40 milhões o número de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo. De 1980 a 2007 foram notificados no Brasil 474.273 casos de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo 26.757 casos no Centro Oeste (BRASIL, 2007). O Brasil apresenta taxa de prevalência de 0,6% na população de 15 a 49 anos (BRASIL, 2007).

A epidemiologia das infecções fúngicas invasivas vem mudando ao longo das últimas duas décadas, em função do aumento da incidência de micoses oportunistas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos. Tais infecções em geral ocorrem associadas a transplantes de órgãos ou de medula óssea, doenças neoplásicas, imunodeficiência primária ou adquirida, endocrinopatias e tratamentos com agentes imunossupressores (GROLL *et al.*, 2009).

As infecções fúngicas sistêmicas de maior prevalência nos Estados Unidos da América são causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo denominadas de aspergiloses. As espécies *fumigatus* (maior incidência) e *flavus* são os principais agentes causadores da doença. No Brasil, a paracoccidioidomicoses são responsável por 52,1% das infecções fúngicas sistêmicas. Dentre os pacientes portadores de AIDS, com causa de óbito associada a micoses sistêmicas, as criptococoses são apontadas em 50,9% dos casos relatados, seguidas pelas candidíases com taxa de 30,2%. (PRADO *et al.*, 2009). Leveduras do gênero *Candida*, são agentes etiológicos de grande importância clínica nos quadros de fungemias, com prevalência para espécie *Candida albicans* (GROLL & GRIST, 2009; ALANGADEN *et al.*, 2011).

1.2. Candidíase e *Candida albicans*

1.2.1. Candidíase

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. A *Candida albicans*, objeto deste estudo, é encontrado naturalmente na flora dos seres humanos como na pele, trato gastrointestinal e genitourinário e, em geral, até 75% da população não apresenta qualquer sintoma (AKPAN & MORGAN, 2002). Entretanto, pode causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, transplantados e com câncer (OSTROSKY-ZEICHNER & PAPPAS, 2006). Em situações anormais pode ocorrer quebra da homeostase, o equilíbrio com o hospedeiro, o fungo passa ser patogênico.

A candidíase oral, forma mucocutânea da infecção, é uma infecção oportunista que pode ocorrer devido a alguns fatores: função diminuída da glândula salivar; uso de medicamentos específicos; uso de dentaduras; dieta rica em carboidratos; tabagismo; gravidez; diabetes *mellitus*; síndrome de Cushing; tumores malignos; condições imunossupressoras, como pacientes portadores de HIV (AKPAN & MORGAN, 2002). Estudos recém-divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) relatam que cerca de 40-50% dos indivíduos com HIV têm infecções orais por fungos, sendo a candidíase pseudomembranosa oral as lesões orais de maior casuística e um marcador de prognóstico para estes pacientes (http://www.who.int/oral_health/publications/cdoe0432/en/ acessado em 21/06/2013).

O diagnóstico adequado das infecções por *Candida* deve ser feito considerando-se o quadro clínico do paciente, o aspecto das lesões, além da visualização por microscopia das leveduras e hifas em esfregaço feito com material coletado da região infectada. A identificação da espécie é possível através da cultura e isolamento do fungo (FUNASA, 2000).

A candidíase vulvovaginal é a segunda infecção vaginal mais comum na América do Norte, listada entre as Doenças Sexualmente Transmitidas (DSTs) de notificação compulsória (SOBEL *et al.*, 1998). Esta infecção tem uma alta prevalência em mulheres durante a sua vida reprodutiva. Cerca de 75% das mulheres apresenta, pelo menos, um episódio de candidíase vulvovaginal ao longo da vida e 5-10% podem desenvolver recorrência (KIM & SUDBERY, 2011). As recorrências se caracterizam por, pelo menos, quatro episódios de vaginite por *Candida spp.* no prazo de um ano (GIRALDO *et al.*, 1998). Outros fatores predisponentes à infecção são: diabetes *mellitus*; uso de antibióticos tópicos e sistêmicos e hábitos inadequados de higiene (HOLANDA *et al.*, 2005). A *C. albicans* é também, nestas infecções, a espécie isolada com maior frequência (74 – 95%), seguido da *C. glabrata* (14,5%) que, dentre as espécies não albicans, é a de maior índice de incidência (10-20%) (SOBEL *et al.*, 1992; GALLE *et al.*, 2004).

A candidíase do sistema urinário, caracterizada pelo crescimento de colônias de *Candida sp* em cultura de urina, ocorre em 20% dos pacientes hospitalizados

expostos a fatores de risco; em mulheres de idade avançada e em indivíduos que fazem uso de antibióticos de amplo espectro e de corticosteróides. Desta forma, as três espécies em ordem de incidência são: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (SOBEL *et al.*, 2011).

A candidemia ou candidíase sistêmica é uma infecção hospitalar de grande importância, a qual é considerada um problema de saúde pública pelos altos índices de morbidade e mortalidade, cujo agente etiológico principal é a *Candida albicans* (COLOMBO, 2006; TUMBARELLO, 2007). A candidíase invasiva ocorre quando a infecção passa de superficial à disseminada. Como fatores predisponentes são citados: a neutropenia; a administração prolongada de antibióticos; o acesso venoso profundo, em pacientes mantidos com nutrição parenteral; as cirurgias do trato gastrointestinal e a colonização em partes do corpo do indivíduo como pele, saliva e urina. Os sintomas da candidíase sistêmica são semelhantes ao de uma sepse (HARRISON & BROUWER, 2005). Além do quadro clínico, o diagnóstico da infecção é feito através do isolamento do microorganismo em biópsia de tecido dos órgãos comprometidos ou em fluidos corporais como: sangue, líquido ou medula óssea (FUNASA, 2000).

Adicionalmente, *Candida spp* tem emergido como uma das principais causas de infecção sistêmica em pacientes hospitalizados, especialmente em doentes graves. O valor bruto da taxa de mortalidade em pacientes com candidíase sistêmica encontra-se na faixa de 35% a 60%, com predominância da *Candida albicans* (> 50%), seguida das espécies: *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, responsáveis por 40% das ocorrências (SHENG-YUAN & PO-REN, 2009). Pacientes com maior risco de candidíase sistêmica são aqueles que se encontram em Unidade de Terapia Intensiva, neutropênicos, com câncer, submetidos a procedimentos cirúrgicos, prematuros e imunodeprimidos (AGUADO *et al.*, 2011).

No Brasil, Colombo e colaboradores conduziram um estudo epidemiológico reunindo dados sobre infecções sistêmicas, documentados em quatro hospitais da cidade de São Paulo. Durante um período de 12 meses (março – 2002 a fevereiro - 2003) foram observados 7.038 episódios de bacteremias e fungemias, sendo que a

Candida spp respondeu por 4,3% do total das infecções sistêmicas (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Outro estudo de igual importância foi desenvolvido por Yamamoto e colaboradores (2012). O estudo foi realizado com 18.258 pacientes admitidos nos hospitais universitários de Cuiabá no período de 20 meses (março – 2008 a novembro – 2009). Destes pacientes 11,4% (2088 pacientes) foram acometidos com infecção hospitalar, sendo 5% por *Candida*, com níveis de mortalidade e letalidade, respectivamente de 14,4% e 53,8%. Em todos os casos estudados a espécie *Candida albicans* foi a de maior prevalência.

1.2.2. *Candida albicans*

A espécie *Candida albicans* pertence ao gênero *Candida* e se caracteriza por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente de 2,0 a 2,4 μm (GUARRO, 1999). Sua reprodução ocorre por brotamento ou gemulação [Figura 1, seta].

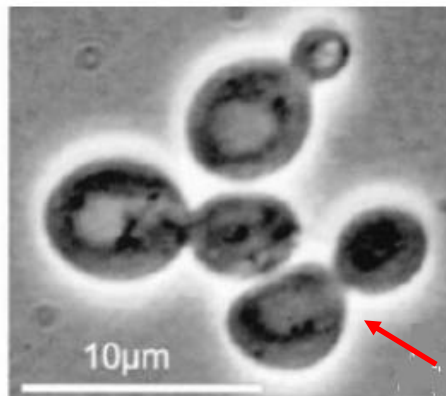


Figura 1: Gemulação ou brotamento, processo reprodutivo das leveduras. Barra de aumento: 10 μm . Adaptado de Laun *et al.*, 2008.

Em algumas espécies do gênero *Candida*, como na espécie *C. albicans* ocorre formação de brotos que não se separam uns dos outros, chamados de blastoconídeos, podendo dar origem a cadeias de células como os tubos germinativos e as pseudo-hifas (MOLERO *et al.*, 1998). Os tubos germinativos são considerados um estágio de transição entre leveduras e hifas. As pseudo-hifas podem ocorrer quando na formação de brotos estes se alongam e ocorre falha na separação a partir da célula mãe, originando filamentos de brotos alongados, que

mantem constrições na junções do septo (KIM & SUDBERY, 2011). Os filamentos de pseudo-hifas podem consistir apenas em células alongadas, assemelhando-se a hifas. A capacidade de mudar rapidamente, em resposta a estímulos ambientais, da forma de levedura para a forma filamentosa ou vice-versa, é considerada um fator de virulência crítico para estes fungos (BENDEL *et al.*, 2003). Esta variação pode ocorrer em função de alguns fatores, tais como: necessidade de adaptação do fungo ao hospedeiro; alterações de pH e dos níveis de oxigênio; variação de temperatura e disponibilidade de nutrientes (SANTOS *et al.*, 2006). Esta mudança estrutural é de extrema importância no processo de invasão à célula do hospedeiro, sendo a forma filamentosa a forma invasiva e por isso mais infecciosa do fungo.

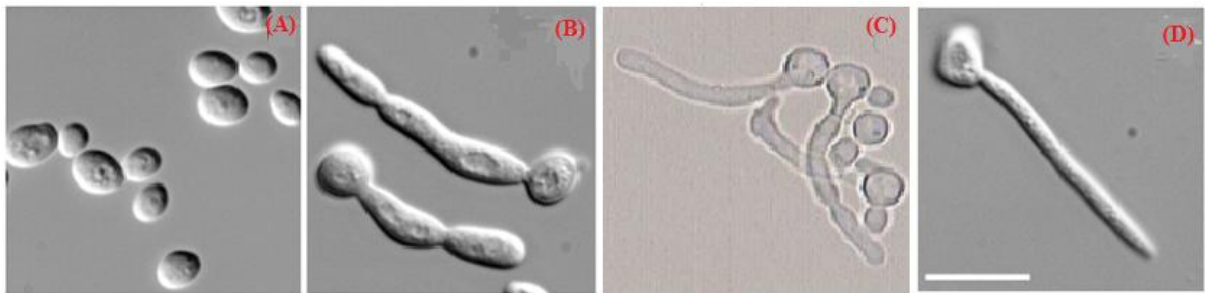


Figura 2: Diferentes morfologias de *C. albicans*. (A) Levedura. (B) Pseudo-hifa. (C) Tubo germinativo. (D) Hifa. Barra de aumento: 10 μ m. Adaptado de Wightman *et al.*, 2004 ; Braga-Silva & Santos, 2011.

C. albicans, assim como os demais fungos, são dotadas de parede e membrana celular. A parede celular, composta de polímeros de β -glucana e quitina, tem a função de proteção do fungo a danos físicos e osmóticos, sendo também responsável por sua nutrição. Além de exercer tais funções biológicas importantes para a sobrevivência do fungo, é o sítio onde se encontram os antígenos do microorganismo. Os principais constituintes desta estrutura capaz de despertar uma resposta imune do hospedeiro são as proteínas e glicoproteínas, com maior predominância das manoproteínas (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004). A membrana celular dos fungos é composta de ergosterol, sendo este um diferencial das células dos mamíferos, que se apresentam com o colesterol como componente. Desta forma o ergosterol torna-se um alvo importante para os agentes antifúngicos (AHMAD *et al.*, 2010).

Uma outra característica importante da *C. albicans* é a sua capacidade de aderir a estruturas como catéteres, prótese e epitélio formando biofilmes. Estas são definidas como estruturas microbianas comunitárias que aderem à uma superfície sendo revestida de uma matriz de exopolissacarídeos (β -1,3 glucana). Os biofilmes são estruturas que além de bastante resistentes a ação dos antifúngicos, protegem o fungo contra o sistema de defesa do hospedeiro. Desta forma constitui atualmente um grande problema clínico, visto o crescente uso de dispositivos médicos cirúrgicos associado a consequente necessidade do uso de imunossupressores favorecendo a formação destas estruturas (DOUGLAS, 2003).

1.2.2.1. Fatores de Virulência de *Candida albicans*

Candida albicans é, sem dúvida, a espécie com maior frequência dentre as demais espécies de *Candida* isoladas de lesões de infecções superficiais e invasivas, em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo, sendo um dos principais fatores de patogenicidade e virulência: capacidade de aderência a diferentes estruturas e epitélios; dimorfismo, com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular; variabilidade fenotípica; termotolerância significativa; produção de enzimas, como proteinases e fosfolipases, envolvidas com a patogenicidade e virulência (YANG, 2003).

A adesão da levedura às células do hospedeiro é pré-requisito para que ocorra a colonização e consequente, invasão, disseminação e danos ao tecido, caracterizando a evolução da infecção, a candidíase (COTTER & KAVANAGH, 2000, NAGLIK *et al.*, 2011). As leveduras de *C. albicans* possuem a propriedade de expressar grande número de enzimas hidrolíticas que são capazes de degradar barreiras protetoras dos tecidos, favorecendo a adesão das leveduras à pele e à mucosa do hospedeiro (NAGLIK *et al.*, 2011; BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Uma estratégia também inerente aos fungos patogênicos para colonizar tecidos, é a capacidade de evasão que os fungos apresentam, a qual impede a ação das células de defesa do sistema imunológico e possibilita infecções no hospedeiro (BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011).

A interação física da levedura de *C. albicans* com células do endotélio do hospedeiro estimula, quase que imediatamente, a transição do fungo para a forma filamentosa. Esse processo favorece o desenvolvimento da infecção devido a variabilidade antigênica da parede celular e o formato micelial, que além de proporcionar maior aderência e facilitar a penetração do fungo no tecido, dificulta a ação de fagócitos do sistema imune do hospedeiro (NAGLIK *et al.*, 2011).

A variabilidade fenotípica, peculiar ao gênero *Candida* leva, além de alterações morfológicas do agente infeccioso a alterações das propriedades da superfície celular, com mudanças na sensibilidade as drogas antifúngicas.

A produção de enzimas extracelulares tem demonstrado ser um importante mecanismo de patogenicidade do fungo. As mais estudadas e que atuam durante as várias fases do processo de desenvolvimento da infecção fúngica oportunista são as aspártico peptidases secretadas (SAPs). Estas enzimas participam no processo de adesão do fungo às células do epitélio, com degradação de proteínas da matriz extracelular, assim como de outras moléculas relacionadas com a defesa imunológica do indivíduo infectado (BRAGA-SILVA & SANTOS 2011).

1.3. Tratamento das Infecções Causadas por *Candida albicans*

1.3.1. Antifúngicos Clássicos e *C. albicans*

Medicamentos antifúngicos são fármacos capazes de inibir a proliferação (fungistáticos) ou causar a destruição do fungo (fungicidas). Podem ser de administração tópica ou sistêmica, com uso terapêutico ou profilático, em pacientes imunossuprimidos. Para o sucesso da terapêutica alguns pontos são fundamentais: o diagnóstico precoce da infecção; a identificação do agente e o conhecimento do mecanismo de ação dos antifúngicos, minimizando assim o surgimento de cepas resistentes (RUIZ-CAMPS & CUENCA-ESTRELA, 2009).

As classes de antifúngicos cujo mecanismo de ação encontra-se envolvido com o ergosterol e sua biossíntese são os polienos, as alilaminas e os azólicos. Os polienos (nistatina e Anfotericina B) são macromoléculas de cadeias insaturadas que

se ligam ao ergosterol formando poros ou canais, desestabilizando a integridade osmótica da membrana, causando inchaço e ruptura da célula fúngica. A Anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro de ação sendo um antifúngico de eleição para infecções sistêmicas. Sua administração é feita por via venosa, com uso limitado às unidades hospitalares. A Anfotericina B apresenta alguns efeitos adversos, além de relatos de nefrotoxicidade e de resistência adquirida pelo uso prolongado (RUIZ-CAMPS & CUENCA-ESTRELA, 2009; COWEN *et al.*, 2010). A nistatina possui o mesmo mecanismo de ação da Anfotericina B com emprego nos quadros de candidíases cutânea, vaginal ou oral.

Assim como os polienos, as alilaminas, representadas clinicamente pelas terbinafina, também possuem ação fungicida. Estas moléculas interferem na síntese do ergosterol por inibição da enzima esqualeno epoxidase, causando acúmulo do esqualeno que leva à ruptura da membrana e morte do fungo. A terbinafina é o único antifúngico sistêmico em uso deste grupo (COWEN *et al.*, 2002).

Os azólicos atuam interagindo com a enzima lanosterol 14- α -demetilase, associada ao citocromo P-450, evitando a dimetilação do lanosterol, que acarreta acúmulo dos esteróis metilados precursores do ergosterol. Este processo induz uma alteração estrutural da membrana fúngica, com inibição significativa do crescimento do fungo, caracterizando sua ação fungistática. Nesta classe estão os imidazólicos (cetoconazol e miconazol) e os triazólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol). Esta classe geralmente não apresenta toxicidade severa, mas, casos de hepatotoxicidade e resistência adquirida pelo uso prolongado têm sido relatados, particularmente para o cetoconazol e o fluconazol (COWEN *et al.*, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

A classe das equinocandinas apresenta atividade fungicida contra um grande número de patógenos dos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Histoplasma*. Sua atividade envolve a inibição da síntese da enzima β -(1-3)-glucana, a qual impede a formação de polímeros de glucana, um componente essencial da parede celular fúngica, e não são metabolizados pelas enzimas do citocromo P450. Nesta classe está incluído o acetato de caspofungina de uso intravenoso. Este fármaco apresenta

bons resultados no tratamento das infecções por *C. albicans*, tanto naquelas resistentes quanto nas sensíveis ao tratamento com fluconazol (HOANG, 2001). Um estudo comparativo realizado em 2002 por Mora-Duarte e colaboradores revelou ser a caspofungina tão eficaz quanto a Anfotericina B nos quadros de candidíases e candidemias, sendo a ela associados menos efeitos adversos (MORA-DUARTE *et al.*, 2002).

A *C. albicans* é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico. Entretanto, casos de resistência adquirida a antifúngicos clássicos, como os azólicos cetoconazol e fluconazol e Anfotericina B tem sido descritos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Considerando o atual cenário no qual se observa um aumento crescente na ocorrência de infecções por *C. albicans*, especialmente em pacientes imunossuprimidos, acrescido de outros fatores como: o prolongado tempo da terapia antifúngica; o custo e os efeitos colaterais; a resistência dos fungos aos medicamentos atualmente disponíveis na clínica, a busca por novas terapias se faz relevante (SHENG-YUAN & PO-REN, 2009).

1.3.2. Terapias Complementares e Infecções Fúngicas

O termo “Terapias Complementares” vem muito adequadamente, aos poucos, substituindo o termo “Terapias Alternativas”. As terapias complementares visam auxiliar o bem estar do paciente, promovendo melhoria em seu quadro clínico, além de ampliar o arsenal terapêutico, minimizar custos e efeitos adversos das terapias convencionais. No Brasil, a homeopatia, a fitoterapia e a acupuntura estão incluídas dentro da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Ministério da Saúde, denominada PNPIC (BRASIL, 2006). A PNPIC foi em parte estimulada por dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em documentos como “Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional” (OMS, 2002). Nestes, o desenvolvimento de políticas estratégicas que garantam os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, além do uso racional de práticas integrativas de

saúde vêm sendo mundialmente estimulado. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, inclusive para o tratamento das infecções fúngicas.

Em ensaios *in vitro* Candiracci e colaboradores (2012) investigaram os efeitos dos flavonóides do mel na inibição do dimorfismo em células de *C. albicans*. Estes flavonóides apresentaram efeito protetor ao inibir a geração de espécies reativas de oxigênio, durante a formação do tubo germinativo, e a atividade c-glutamiltanspeptidase, responsável pela degradação GSH (L-gama-glutamil-L-cisteína-glicina), durante a formação das hifas (CANDIRACCI *et al.*, 2012).

A combinação aditiva e sinérgica entre óleos essenciais vegetais e antimicrobianos é uma estratégia no combate a agentes microbianos (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009). Silva e colaboradores (2011) realizaram um estudo para avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Coriandrum sativum* (coentro) em associação com o antifúngico clássico Anfotericina B contra diferentes espécies do gênero *Candida* (SILVA *et al.*, 2011). O estudo indicou que o efeito fungicida do óleo essencial estava correlacionado a danos na membrana citoplasmática, com subsequente extravazamento dos componentes intracelulares, além de causar redução acentuada na percentagem de formação de tubos de germinativos de *C. albicans*. Os autores evidenciaram também efeito sinérgico entre o óleo de coentro e a Anfotericina B para *C. albicans* e, potencializador (aditivo), para *C. tropicalis* (SILVA *et al.*, 2011).

Os efeitos antimicrobianos do extrato etanólico de *Ecballium elaterium* (mormódica) frente a cepas de *C. albicans* tem sido descritos com a possibilidade do uso simultâneo a antifúngicos e a antibióticos, visando potencializar os efeitos antimicrobianos (ADWAN *et al.*, 2011).

Estudos clínicos como os realizados por Karaman e colaboradores (2009) demonstraram que a administração oral de *Curcuma longa* (açafrão) em animais com histopatologia pulmonar e infecção de orofaringe por *Candida* foi capaz de reverter as alterações pulmonares crônicas, além de diminuir a carga fúngica no

modelo de candidíase de orofaringe. Estes resultados foram obtidos tanto pelo açafão isolado, quanto em associação a dexametasona (KARAMAN *et al.*, 2011).

Outro grupo de pesquisadores avaliou a eficácia do *Panax quinquefolius L* (ginseng-americano) contra a infecção por *C. albicans* induzida em camundongos (TRAMMELL *et al.*, 2012). Os índices de morbidade e mortalidade, os títulos de *C. albicans* e as concentrações de quimiocinas e citocinas inflamatórias foram avaliados. Como resultados não foram observadas alterações nos índices de morbidade e nem de mortalidade; entretanto, títulos significativamente mais baixos de *C. albicans* e concentrações significativamente mais baixas de algumas citocinas inflamatórias foram detectados no rim e / ou no soro dos animais tratados (TRAMMELL *et al.*, 2012).

As propriedades antifúngicas das correntes elétricas contínuas vêm sendo investigadas por Holandino e colaboradores. Utilizando o modelo de *C. albicans* sendo possível verificar alterações morfológicas e diminuição na expressão das enzimas aspártico peptidases secretadas (SAPs), que são fatores de virulência de extrema importância, quando *C. albicans* foram tratadas por diferentes intensidades de corrente elétrica (BARBOSA, 2011).

Adicionalmente, dentre as várias estratégias de tratamento possíveis para a candidíase destacamos a pesquisa e o emprego de formulações homeopáticas. O preparo dos medicamentos homeopáticos envolve uma farmacotécnica específica (BRASIL, 2011), regulamentada pela ANVISA e registrada na Farmacopeia Homeopática Brasileira (FHB).

1.3.2.1. A Homeopatia

A homeopatia é uma terapêutica que consiste na administração de doses mínimas de soluções diluídas e dinamizadas visando o tratamento e a profilaxia de diversas doenças (FONTES *et al.*, 2013). Trata-se de um sistema terapêutico baseado no princípio hipocrático da semelhança *similia similibus curantur* (séc. IV a.C), reavivada por Paracelso (1493 – 1591), consolidada e desenvolvida pelo

médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann no ano de 1796 (TEIXEIRA, 2000; PUSTIGLIONE, 2001; CORNILLOT, 2005; FONTES *et al.*, 2013).

Samuel Hahnemann nasceu em 10 de abril de 1755 na cidade de Meissen – Alemanha Oriental e morreu aos 88 anos, em Paris. Coursou medicina em Leipzig, no curso intitulado: “Ensino das Ciências e da Medicina”, tendo sustentado seus estudos com aulas particulares de alemão e francês. À época, trabalhou também como tradutor de livros, atividade que enriqueceu em muito, seus conhecimentos médicos. Em 1777, seguiu para Viena, onde concluiu sua formação médica em 1780 (TÉTAU, 2001). Além de estudar as doenças e as terapias da época, Hahnemann pesquisou sobre as correntes filosóficas, o organicismo e o vitalismo. Se tornando partidário do vitalismo, pois para ele o princípio vital era a causa e não a consequência da estrutura orgânica (FONTES *et al.*, 2013). Exerceu a medicina por oito anos, teceu várias críticas às terapias da época, quando em 1787 abandonou a medicina: “... renunciei a prática da medicina para não mais correr o risco de causar danos à saúde alheia ...” (HAHNEMANN, 1787). A partir desta renúncia, passou então a se dedicar aos estudos da química e às ocupações literárias (FONTES *et al.*, 2013).

Em 1790, ao traduzir a Matéria Médica do médico escocês, Willian Cullen, Hahnemann questionou as propriedades medicinais da casca da quina (*China officinalis*) atribuídas pelo autor. Indignado passou a fazer uso da quina em si mesmo, sentindo todos os sintomas semelhantes a de um paciente com malária. Registrou cada um dos sinais por ele sentido e observou que, ao suspender o uso da droga, os sintomas desapareciam. Este experimento deu origem ao método de experimentação científica, protocolado por Hahnemann e, posteriormente denominado de experimentação no homem sadio (TEIXEIRA, 2000; BRASIL, 2011). O resultado desse experimento chamou a atenção de Hahnemann para o princípio hipocrático da semelhança, ou seja, a mesma droga usada para a cura da malária tinha a propriedade de desenvolver no homem sadio os mesmos sintomas da doença. Hahnemann então experimentou inúmeras substâncias sempre no organismo sadio, realizou extensa pesquisa sobre sinais e sintomas causados por

substâncias tóxicas, catalogando os efeitos encontrados em publicações científicas que deram origem à Matéria Médica Homeopática (SOARES, 1997; TEIXEIRA, 2000).

No início de seus estudos, Hahnemann usou doses ponderais induzindo assim, intoxicações medicamentosas. Com o intuito de minimizar estes efeitos tóxicos passou a usar grandes diluições, chamadas de doses infinitesimais, para tratar seus pacientes. Em uma fase posterior, passou a diluir e agitar as substâncias num processo de dinamização, pois observou em seus estudos que desta forma obtinha respostas clínicas diferentes e melhores (TEIXEIRA, 2000; FONTES *et al.*, 2013).

Hahnemann publicou no *Journal of Practical Pharmacology and Surgery* seu primeiro trabalho que descreve as propriedades curativas das substâncias medicinais, intitulado: “Ensaio sobre um novo princípio para descobrir as propriedades curativas das substâncias medicinais” (1796). Esta publicação e o ano de 1796 são considerados marcos de criação da homeopatia (TEIXEIRA, 2000; PUSTIGLIONE, 2001; CORNILLON, 2005).

Atualmente, a homeopatia é praticada em vários países nos diferentes continentes, estando especialmente bem representada na Alemanha, Argentina, Bélgica, Brasil, França, Índia e Inglaterra (FONTES *et al.*, 2013). No Brasil, mais especificamente no Rio de Janeiro, a homeopatia foi introduzida em 1840 pelo médico francês, natural da cidade de Lyon, Dr. Beniot Jules Mure, mais popularmente conhecido como Bento Mure. O ensino, a prática e a propagação da homeopatia foram introduzidos por Mure garantindo a difusão da homeopatia por todo o Brasil (COSTA, 2002; BRASIL, 2011; FONTES *et al.*, 2013).

O cenário, à época, contava com a importação das matérias primas da Europa, não existindo ainda farmácias e nem tão pouco legislações específicas para a manipulação de medicamentos. Entretanto, com a evolução das áreas da Farmácia e da Medicina, houve a separação natural de ambas, ocorrida no ano de 1851 (FONTES *et al.*, 2013). Com isto, surgem as primeiras farmácias, originalmente

denominadas de boticas, nas quais a manipulação homeopática e alopática era realizada. A partir de 1965, surgem no Brasil leis específicas para a farmácia homeopática, sendo então a preparação dos medicamentos homeopáticos regulamentada pela Farmacopeia Homeopática Francesa. Somente em 1976 através do Decreto nº. 78.841, foi aprovada a parte geral da primeira edição da Farmacopeia Homeopática Brasileira (TÉTAU, 2001; FONTES *et al.*, 2013), publicada em 1977 (BRASIL, 2011).

A Farmacopeia Homeopática Brasileira (FHB) é o documento que orienta e regulamenta os setores farmacêuticos envolvidos com a produção dos medicamentos homeopáticos (BRASIL, 2011). A FHB atualmente está em sua 3ª edição, aprovada pela ANVISA, em setembro de 2011 e disponibilizada gratuitamente a qualquer cidadão brasileiro (www.anvisa.gov.br).

No Brasil, a homeopatia é uma especialidade médica e farmacêutica reconhecida em 1980 pelo Conselho Federal de Medicina, através da Resolução CFM 1000/80 (www.portalmedico.org.br, acessado em 20/05/2013) e, posteriormente, em 1992 pelo Conselho Federal de Farmácia através da Resolução CFF 232/92, respectivamente (www.cff.org.br, acessado em 20/05/2013). Em maio de 2006 o Ministério da Saúde (MS) aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares através da publicação da Portaria nº 971/06. Esta política contempla em suas diretrizes a disponibilidade do serviço no SUS e o apoio ao desenvolvimento de pesquisas envolvendo as práticas complementares (BRASIL, 2006).

Em dezembro de 2007, através da Portaria número 3237, o Ministério da Saúde, incluiu os medicamentos homeopáticos que integram a Farmacopeia Homeopática Brasileira na rede SUS (Sistema Único de Saúde), em conformidade com o que recomenda a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (<http://portal.saude.gov.br> – acessado em 03/06/2013).

O Brasil foi o primeiro país no mundo a criar uma política nacional voltada para as Práticas Integrativas e Complementares, classificando a homeopatia como

um sistema complexo de abordagem integral e dinâmica do processo saúde-doença, com ações no campo de agravos, promoção e recuperação da saúde do ser humano (BRASIL, 2006). A implementação da PNPIC vem acontecendo de maneira gradual. O governo federal incrementou em 383% o investimento em consultas homeopáticas, aumentando de R\$ 611.367,00, em 2000, para R\$ 2.953.480,00 no ano de 2008 o custeio das mesmas nas várias esferas do SUS (<http://portal.saude.gov.br> – acessado em 03/06/2013). Outras ações estão previstas nesta política como destacado na Diretriz H4, na qual o estímulo ao desenvolvimento de pesquisas científicas no campo das práticas integrativas e complementares é enfatizado. A seguir, um trecho da Diretriz H4: “apoiar técnica e financeiramente a estruturação física da homeopatia nos centros de referência, com atribuições: na implementação de atividades de ensino em serviços (estágios, formação e educação permanente); no desenvolvimento de pesquisas em homeopatia de interesse para o SUS; na integração de atividades de assistência, ensino e pesquisa, em articulação com princípios e diretrizes estabelecidos para a Educação” (BRASIL, 2006).

1.4. A Terapêutica Homeopática

Em vista do binômio saúde-doença da concepção homeopática abranger aspectos diversos da individualidade humana, o médico homeopata deve prescrever o medicamento englobando as características psíquicas, emocionais, gerais e físicas do paciente (TEIXEIRA, 2007) fundamentadas nos quatro princípios básicos da homeopatia: o “Princípio da Semelhança”; a “Experimentação no Homem Sadio”; “Doses Mínimas” e “Medicamento Único” (SOARES, 1997; BRASIL, 2011; FONTES *et al.*, 2013).

1.4.1. O Princípio da Semelhança

A palavra homeopatia foi criada por Hahnemann e é oriunda do grego onde *hómios* significa “semelhante” e *páthos* “doente”. Desta forma, o método terapêutico é baseado na lei natural de cura citada por Hipócrates “*similia similibus curantur*”; ou seja, o semelhante será curado pelo semelhante. Assim, qualquer substância capaz

de provocar um conjunto de sinais e sintomas em indivíduos sadios, porém sensíveis, se prescrita adequadamente e, especialmente preparada, é capaz de curar um doente que apresente um quadro patológico semelhante, com exceção das lesões irreversíveis (SOARES, 1997; FONTES *et al.*, 2013).

1.4.2. O Princípio da Experimentação no Homem Sadio

A experimentação no homem sadio, “*experientia in homine sano*”, também chamada de experimentação patogenética homeopática ou pura, é o procedimento de testar substâncias medicinais em indivíduos sadios para elucidar os sintomas que irão refletir sua ação (FONTES *et al.*, 2013). Esta experimentação foi utilizada na época por Hahnemann e, na atualidade, pode ser entendida como experimentação medicamentosa. Isto corresponde ao conhecimento da farmacodinâmica homeopática que é representada pelas matérias médicas, que contêm a patogenesia dos medicamentos homeopáticos, que são resultantes de estudos experimentais, dados da toxicologia e observação clínica (SOARES, 1997). A patogenesia de um medicamento é o conjunto de sinais e sintomas apresentado por um organismo sadio ao experimentar determinada substância, sendo o conjunto destes sintomas catalogados em Matérias Médicas. Hahnemann relata no Organon, §111, o efeito patogenético das substâncias (PUSTIGLIONE, 2001).

1.4.3. Doses Mínimas

No início do desenvolvimento da homeopatia Hahnemann usou doses ponderais. Entretanto, ao observar agravação dos sintomas, realizou uma série de experiências, com resultados interessantes. Inicialmente, empregou pequenas doses, diluindo os medicamentos em água ou álcool (FONTES *et al.*, 2013). Entretanto observou que, se os medicamentos não fossem suficientemente fortes para produzir agravação dos sintomas, não seriam capazes de promover satisfatoriamente a reação orgânica. A partir de então passou não só a diluir os medicamentos, como também a imprimir a estes, agitações violentas, as quais denominou de sucussões. Hahnemann percebeu então que, além da diminuição da

agravação dos sintomas e efeitos tóxicos das altas doses, ocorria um aumento da reação orgânica (KOSSAK-ROMANACH, 2003; FONTES *et al.*, 2013).

A partir destes experimentos, Hahnemann passou a fazer diluições infinitesimais potencializadas por fortes agitações. Esse processo farmacotécnico, denominado de dinamização, obedece a uma progressão geométrica, que promove a diminuição da concentração química e o aumento da ação dinâmica do medicamento que é capaz de estimular a reação do organismo em direção à cura (SOARES, 1997; PUSTIGLIONE, 2001; KOSSAK-ROMANACH, 2003; FONTES *et al.*, 2013).

1.4.4. Medicamento Único

Um único medicamento é testado por vez durante a experimentação patogénica, obtendo por meio desse procedimento as características farmacodinâmicas da substância testada. Por isso Hahnemann administrava um medicamento por vez, por julgar mais racional e para impedir as interações entre diferentes substâncias (FONTES *et al.*, 2013).

1.5. Medicamentos Homeopáticos

As formas farmacêuticas derivadas são o resultado do processo de dinamização, consistindo basicamente na concentração decrescente dos insumos ativos por meio de diluições seguidas de sucussões, quando o insumo ativo é solúvel em misturas hidroalcoólicas. A sucussão é uma técnica na qual a solução é submetida a movimentos vigorosos e ritmados do antebraço de um manipulador contra um anteparo semirrígido (sucussão manual) podendo também ser feita por equipamento específico (sucussão mecânica). Para insumos ativos insolúveis é necessário utilizar outra técnica de dinamização, na qual se faz a trituração em lactose, até que o insumo ativo se torne solúvel em misturas hidroalcoólicas. O preparo dos medicamentos homeopáticos envolve, portanto, um processo de diluição em diferentes proporções, seguidas de sucussões e/ou triturações sucessivas. Estas diluições podem ser feitas em diferentes proporções,

caracterizando as escalas homeopáticas, que são: decimal, centesimal e cinquenta milesimal (BRASIL, 2011).

Na escala decimal a diluição é preparada na proporção de 1:10, ou seja, uma parte do insumo ativo é diluída em nove partes de insumo inerte, perfazendo um total de dez partes (BRASIL, 2011). Esta escala foi criada por Hering, nos Estados Unidos e posteriormente foi difundida na Alemanha, sendo simbolizada nos diversos países através da letra X (dez em algarismos romanos), D, ou ainda DH (FONTES *et al.*, 2013). No Brasil emprega-se o símbolo DH antecedido do número referente à potência (BRASIL, 2011).

A escala centesimal, criada por Hahnemann, é preparada na proporção de 1:100, sendo uma parte do insumo ativo diluída em noventa e nove partes de insumo inerte, perfazendo um total de cem partes (BRASIL, 2011). A escala centesimal pode ser simbolizada por: C, o indicador ordinal ^a, nenhuma indicação ou CH, como adotado no Brasil (FONTES *et al.*, 2013). Na cinquenta milesimal a diluição é feita na proporção de 1:50.000 sendo a mesma simbolizada por: Q ou LM, sendo o segundo adotado no Brasil (BRASIL, 2011).

1.5.1. Origem dos Medicamentos Homeopáticos

Os medicamentos homeopáticos podem ser preparados a partir de espécimes vegetais, minerais e animais. Os microrganismos também podem ser utilizados como insumos ativos para o preparo destes medicamentos constituindo uma classe de medicamentos, denominada bioterápicos (BRASIL, 2011; FONTES *et al.*, 2013).

1.5.2. Bioterápicos

Bioterápicos é a classificação dada pela Farmacopeia Homeopática Brasileira (FHB) às preparações medicamentosas obtidas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, tecidos, órgãos, produtos de origem microbiana e alergenicos (BRASIL, 2011). Essas preparações podem ser de origem patológica (nosódios) ou não patológica (sarcódios),

elaboradas conforme a farmacotécnica homeopática. As substâncias que dão origem aos bioterápicos são identificadas como “fonte para bioterápicos”, sendo fundamental que sua identificação seja adequada. Os bioterápicos são também denominados nosódios (ABFH, 2007; BRASIL, 2011).

O termo nosódio, deriva do grego *nósos* (doença), e é a preparação homeopática que tem como origem material patológico animal ou vegetal (BRASIL, 2011; FONTES *et al.*, 2013). O primeiro nosódio foi criado por Constantine Hering médico discípulo de Hahnemann e contemporâneo do período de descoberta da varíola e sua vacina, em 1834 (HERING, 1834 *apud* FONTES *et al.*, 2013). Motivado pelos acontecimentos da época, Hering criou a primeira preparação farmacêutica homeopática obtida a partir de produto patológico, denominada por ele de “nosódio”. Este medicamento foi preparado a partir da serosidade da vesícula da sarna, ao qual chamou *Psorinum* (LYRIO, 2002; FONTES *et al.*, 2013). Em 1910, surgiu a primeira “Matéria Médica dos Nosódios”, escrita por Allen e considerada na época o documento mais importante sobre o tema (LYRIO, 2002).

1.5.3. Bioterápicos Roberto Costa (RC)

Os bioterápicos Roberto Costa (RC) foram criados pelo Dr. Roberto Andrade da Costa, médico brasileiro consciente de que o perfil sanitário do Brasil apontava para a prioridade ao tratamento das doenças infecto-parasitárias, típicas da Medicina Tropical. Como médico, clinicou e trabalhou no campo da pesquisa com nosódios ligados ao tratamento das doenças infecciosas, que constituem uma considerável parcela da sua lista de nosódios (LYRIO, 2002). Bioterápicos RC, também denominados nosódios vivos, são preparações que tem como ponto de partida o microrganismo, na sua forma viva e infectiva. O preparo destes nosódios envolve o uso de veículos capazes de preservar a integridade e o potencial infeccioso dos microrganismos, sendo o soro fisiológico (NaCl 0,9%) um dos solventes de escolha. Os estudos clínicos de Roberto Costa indicaram que os “nosódios vivos” apresentavam potencial terapêutico elevado para diversas doenças de origem microbiana, sendo capazes de estimular o organismo do paciente, provocando uma reação oriunda da memória imunológica do organismo (COSTA,

1984; LYRIO, 2002). Atualmente, estes medicamentos estão classificados pela FHB dentro da categoria de bioterápicos, devendo o seu preparo seguir as orientações descritas neste compêndio oficial no que tange à coleta, o tipo de solvente e as regras de boas práticas de manipulação (BRASIL, 2011).

1.6. Pesquisa Científica e Homeopatia

Um tema redundante na determinação da homeopatia por acadêmicos clássicos, principalmente no campo das chamadas “ciências exatas”, é o fato de que em diluições altas e ultra altas, não são mais detectados traços de qualquer substância química original. Consequentemente estas soluções ultradiluídas teriam a mesma composição química dos respectivos solventes. Entretanto, a luz de, pelo menos, dois séculos de minuciosa observação clínica, evidências científicas tem sido publicadas indicando que as soluções ultra diluídas apresentam propriedades terapêuticas e características físico-químicas que as diferenciam dos seus solventes (BELON *et al.*, 2004; REY, 2007; ELIA *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010; WASSENHOVEN, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Dentre as evidências científicas publicadas com modelos homeopáticos, encontramos estudos de patogênese, que avaliam os sintomas físicos, mentais e emocionais que os medicamentos homeopáticos suscitam nos indivíduos saudáveis. Piltan e colaboradores (2009) realizaram um estudo clínico duplo-cego, randomizado e placebo controlado em 33 voluntários saudáveis. A experimentação patogênica de *Aconitum napellus* 30CH evidenciou que os voluntários apresentaram resposta clínica diferente daqueles que utilizaram placebo (PILTAN *et al.*, 2009).

Bordet e colaboradores (2008) avaliaram tratamentos homeopáticos para os sintomas da menopausa e conseqüente melhoria da qualidade de vida de mulheres nesta fase hormonal. Este estudo foi realizado em 8 países, com a participação de 99 médicos e incluiu 438 mulheres de idade superior a 55 anos. Dentre os medicamentos homeopáticos que foram prescritos, 98% das prescrições foram com medicamentos homeopáticos. Sendo *Lachesis mutus*, *Belladonna*, *Sepia officinalis*, *Sulphur* e *Sanguinaria canadensis* os mais prescritos. O estudo demonstrou redução

significativa na frequência dos episódios dos fogachos e dos desconfortos causados por este sintoma. Noventa e nove por cento das pacientes que relataram o desaparecimento ou diminuição desses sintomas, apresentaram melhora após 15 dias de iniciado o tratamento homeopático.

No Brasil, Garcia e colaboradores (2010), realizaram um estudo avaliando as características físico-químicas e a citotoxicidade de soluções homeopáticas de *Euphorbia tirucalli* L (aveloz) preparadas na escala cinquentamilesimal. Os resultados indicaram que há diferença entre os valores de condutividade elétrica e pH quando as várias potências foram analisadas. Entretanto, tais alterações não apresentaram correlação biológica, quando testadas frente à linhagem de câncer de mama MCF-7 (GARCIA *et al.*, 2010).

Aleixo e colaboradores (2012) avaliaram o efeito de diferentes protocolos de tratamento com bioterápico de *Trypanossoma cruzi* 17DH, sobre a evolução clínica/parasitológica de camundongos infectados com *Trypanossoma cruzi* (cepa Y). Os resultados obtidos a partir de protocolo cego e randomizado indicaram que os animais tratados com o bioterápico apresentaram a melhor evolução clínica e parasitológica, com menores taxas de parasitemia e maiores índices de sobrevivência, especialmente quando tratados a partir do 4º dia de infecção com T. cruzi (ALEIXO *et al.*, 2012).

Bonamin e colaboradores (2013) realizaram um estudo visando analisar o efeito imunomodulador da Timulina 5CH em um modelo experimental de granuloma. Para o estudo foram usados camundongos Balb/C inoculados com BCG, para a indução de granulomas. Os animais foram avaliados após 7 e 21 dias da inoculação e os resultados indicaram que o tratamento com Timulina 5CH foi capaz de melhorar o processo inflamatório do granuloma e a remissão da infecção, por modular a diferenciação de fagócitos (BONAMIN *et al.*, 2013).

Siqueira e colaboradores analisaram (2013) os aspectos celulares e bioquímicos das linhagens MDCK e J774-G8 induzidos por um bioterápico preparado de acordo com a técnica descrita por Roberto Costa, tendo como ponto

de partida o vírus influenza H3N2, infeccioso. Os ensaios demonstraram que o tratamento com este bioterápico na potência 30DH (Influenzinum RC) induziu alterações nas taxas de mitose, no conteúdo de corpos lipídicos, além de mudanças significativas na atividade de 6-Phosphofructo-1-quinase de MDCK. Além disso, os autores comprovaram o efeito estimulatório do Influenzinum RC sobre os macrófagos J774.G8, com aumento significativo da produção de TNF- α em relação aos grupos controle (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Adicionalmente, avaliaram o potencial profilático do Influenzinum RC e do bioterápico IRA (infecções respiratória aguda) em 600 crianças da Estratégia da Saúde da Família de Petrópolis. O medicamento IRA é um bioterápico, utilizado para o tratamento de doenças infecciosas respiratórias agudas, obtido a partir da mistura dos microrganismos *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Influenzinum*. Este estudo clínico triplo-cego, randomizado e placebo controlado comprovou o potencial profilático de ambos os bioterápicos testados para os sintomas da gripe e de infecções respiratórias agudas (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Outros trabalhos científicos evidenciam o efeito de medicamentos homeopáticos em modelos celulares distintos. Estes estudos sugerem que estes medicamentos estimulam a homeostase do organismo, promovem a liberação de citocinas, ativam células macrofágicas, alteram o metabolismo glicolítico, dentre outros efeitos (OLIVEIRA *et al.*, 2006, 2008; SIQUEIRA, 2009; AQUINO *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2010; KUCZERA, 2013).

Desta forma, verificamos que a pesquisa científica em homeopatia vem apresentando evolução significativa desde a sua criação em 1796, conquistando espaço no meio acadêmico, despertando interesse de pesquisadores em diferentes países, inclusive no Brasil, contribuindo com evidências clínicas e científicas sobre a eficácia da terapêutica homeopática.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de bioterápicos de *C. albicans*.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um novo bioterápico de leveduras de *C. albicans* previamente identificadas, a partir de adaptação no protocolo Roberto Costa;
- Avaliar o efeito de diferentes solventes usados para o preparo deste bioterápico na morfologia, ultraestrutura e capacidade de formação de colônias de *C. albicans*;
- Avaliar a condutividade elétrica e o pH de bioterápicos de *C. albicans*;
- Quantificar a presença de leveduras e de *C. albicans* nas várias diluições homeopáticas;
- Avaliar a citotoxicidade dos bioterápicos de *C. albicans* frente às células epiteliais MA104 e às leveduras de *C. albicans*;
- Quantificar os índices de adesão de *C. albicans* frente às células epiteliais MA104 pré-tratadas com os bioterápicos de *Candida albicans*;
- Avaliar o efeito dos bioterápicos de *Candida albicans* sobre a respiração das células epiteliais MA104;
- Avaliar a citotoxicidade e a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos RAW 264-7 tratados com os bioterápicos de *C. albicans*.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Equipamentos e Utensílios

- Agitador digital Heidolph – Unimax 2010
- Autoclave – FABBE – Modelo: 103;
- Balança analítica – Mettler Toledo – AG 204;
- Cabine de Segurança Biológica Classe II – Esco – Airstream;
- Câmara de Neubauer *Bright Line* – BOECO *Germany*;
- Centrífuga – BIO 101 – Thermo Electron Corporation;
- Citômetro de Fluxo – FACScan – Becton Dickinson;
- Condutivímetro – Modelo 227 MPC – Mettler – Toledo;
- Dinamizador Braço Mecânico – Modelo: DENISE – AUTIC;
- Estufa de cultura – FANEM – 002CB;
- Espectrofotômetro Biospectro SP – 22;
- Estufa de esterilização – Modelo 315SE – FANEM;
- Leitor de microplacas – TP – Reader – Thermo Plate;
- Microscópio eletrônico de transmissão – Morgagni 265/FEI;
- Microscópio invertido – Olympus;
- Microscópio óptico – Axioplan II / Zeiss;
- Oxígrafo de alta resolução – Oroboros (Austria);
- Ultramicrótomo – Laica EM UC6 50.

3.1.2. Reagentes

- Acetato de Uranila – SEM (*Electron Microscopy Sciences*)
- Acetona – MERCK®;
- Anfotericina B – Cristália Laboratório Químico Farmacêutico;
- Ágar nutriente – Himedia;
- Albumina de soro bovino (BSA) – SIGMA®;
- Azul de tripan – VETEC®;
- Base de Carbono para Levedura (*Yeast Carbon Base – YCB*) – Sigma - Aldrich;
- Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) – GIBCO®;
- Cloreto de Sódio (NaCl) - USB®;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – REAGEN
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* – GIBCO®;
- Etanol (C₂H₅OH) absoluto – VETEC®
- Glutamina – GIBCO®;
- Glutaraldeído 25% - TED PELLA
- HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietil piperazina] N- 2 etanossulfônico – SIGMA®;
- Hidróxido de Sódio (GIBCO®);
- Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion – BHI*; BD, Becton, Dickson and Company);
- Iodeto de Propídio (PI) – SIGMA®;
- Isotiocianato de Fluoresceína (FITC);
- Meio para Candida CHROMagar® (BD, Becton, Dickson and Company);
- Meio de Sabouraud e Dextrose sólido;
- MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio – SIGMA®;
- Paraformaldeído – SIGMA®;
- Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO®;
- Tampão Salina Fosfato (PBS);

- Tetróxido de Ósmio - Sigma - Aldrich;
- Tripsina – GIBCO®.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo de Soluções

3.2.1.1. Meio de YCB (*Yeast Carbon Base*)

O meio de cultura YCB foi preparado com a dissolução de 2,35 g do meio em 100 ml de água destilada, com pH final entre 5,3 e 5,7. Após o preparo, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C.

3.2.1.2. Solução de Soro Albumina Bovina (BSA)

O BSA foi preparado a partir da solubilização de 1 g em 100 ml de água destilada, na concentração final de 1%. Sendo, posteriormente, filtrado por membrana esterilizante (poro 0,22 µm) e aliqotado em tubos *ependorfs* de 1 ml. A solução BSA foi mantida congelada a - 20°C até o momento de uso.

3.2.1.3. Meio Ágar Batata

Para o preparo do meio ágar-batata, 500 ml de infusão filtrada de batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) foram acrescidas a 15 g de ágar bacteriológico e 10 g de dextrose. A solubilização foi feita à quente com posterior esterilização em autoclave por 15 minutos, a 121°C. O meio pronto foi distribuído em placas de petri descartáveis de 90 X 15 mm, sob condições assépticas, em cabine de segurança biológica classe II. Após o preparo, as placas foram estocadas à temperatura de 4°C (SICRIM & ROCHA, 2004).

3.2.1.4. Meio Ágar Nutriente

Para o preparo do meio ágar-nutriente 28 g do meio foram pesados e adicionados a 1000 ml de água destilada previamente aquecida. A solubilização foi feita por fervura sendo, em seguida, esterilizado em autoclave, por 20 minutos a 121°C. O meio agar-nutriente foi vertido, ainda quente, em placas de petri

descartáveis, em cabine de segurança biológica classe II. Posteriormente, as placas foram estocadas à temperatura de 4°C.

3.2.1.5. Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Para o preparo do meio de cultura de células (DMEM) foram pesadas as seguintes substâncias: 0,2 g de NaHCO₃, 0,3 g de glutamina, 3,0 g de HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietil piperazina] N- 2 etanossulfônico e 10 g de DMEM. Em seguida, após solubilização em água ultra-pura (MiliQ), o pH foi ajustado a 7,4, com NaOH 1 N e, a solução avolumada a 900 ml. Após suplementação com 10% de soro fetal bovino (SFB) o meio foi filtrado com membrana esterilizante de 0,22 µm em cabine de proteção biológica. Ao final da esterilização foram separadas alíquotas em frascos de vidro, os quais foram armazenados sob refrigeração (4°C).

3.2.1.6. Tampão Salina Fosfato (PBS)

A solução tampão salina fosfato (PBS) foi preparada através da dissolução em água ultra-pura (MiliQ) dos seguintes componentes: 0,2 g de KH₂PO₄, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl e 1,44 g de Na₂HPO₄. O pH da solução foi ajustado para 7,4, para um volume final de 1000 ml. O tampão PBS pronto foi fracionado em frascos de vidro e esterilizado em autoclave por 20 minutos, a 121°C. O armazenamento do tampão foi feito em geladeira a 8°C, após resfriamento.

3.2.1.7. Tripsina

Para o preparo da solução de tripsina foram usadas as seguintes substâncias: 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 0,58 g de NaHCO₃, 0,1 g de dextrose, 0,5 g de tripsina, 0,2 g de EDTA e 0,45 ml de vermelho de fenol a 1%. Os componentes foram dissolvidos em água purificada, o pH ajustado para 8,0 e a solução avolumada para 1000 ml. Posteriormente, a solução foi levada a capela de fluxo laminar, filtrada em membrana esterilizante (poro 0,22 µm), alíquotada em frascos de vidro e estocada em congelador a -20°C. Durante o período de utilização a tripsina pronta para uso foi armazenada em geladeira, a 4°C.

3.3. Suspensões Celulares Utilizadas

3.3.1. Suspensão de *Candida albicans*

Para este estudo foram utilizadas as cepas 11 de *C. albicans*, isolada do sangue de um homem de 46 anos (BRAGA-SILVA, *et al.*, 2009) e *C. albicans* ATCC® 10231™ (*American Type Culture Collection*), isolada da secreção brônquica de homem com broncomicose. O estoque das leveduras foi mantido sob refrigeração, a 5°C, em tubos com 5 ml de meio Sabouraud-dextrose sólido acrescido de vaselina esterilizada. Para os diferentes experimentos, suspensões contendo cerca de 10⁸ leveduras/ml foram cultivadas em meio líquido de YCB com 1% de BSA, pH 5,5, a 37°C sob constante agitação, por 48 horas (WHITE & AGABIAN, 1995; SANTOS *et al.*, 2006).

3.3.2. Cultura de Células Epiteliais de Rim de Macaco (MA104)

Células epiteliais de rim de macaco da linhagem celular MA104 foram cultivadas a 37°C, em concentração inicial de 5 x 10⁴ células/ml, utilizando DMEM suplementado com 10% de SFB. A cada 2 dias, as células foram tripsinizadas, o meio de cultura renovado e a viabilidade celular monitorada por azul de tripan, conforme descrito por Holandino e colaboradores (2001).

3.3.3. Cultura de Células de Macrófagos da Linhagem RAW 264-7

As células de macrófagos da linhagem RAW 264-7 foram cultivadas a 37°C em estufa de CO₂, em concentração inicial de 5 x 10⁴ células/ml, utilizando DMEM suplementado com 10% de SFB. A cada 3 dias, as células foram soltas com uso de *scraper*, o meio de cultura renovado e a viabilidade celular monitorada por azul de tripan, conforme descrito por Holandino e colaboradores (2001).

3.4. Preparo dos Bioterápicos de *Candida albicans*

As formulações farmacêuticas escolhidas para o desenvolvimento deste projeto foram os bioterápicos, sendo as mesmas preparadas de acordo com a metodologia descrita na FHB (BRASIL, 2011). Adicionalmente, este preparo seguiu a metodologia preconizada pelo médico homeopata Roberto Costa, com adaptações

quanto ao tipo de solvente utilizado para o preparo das várias dinamizações, sendo o mesmo denominado de bioterápico de *Candida albicans* RC. Para tanto, leveduras de *C. albicans* (10^8 leveduras/ml), de diferentes cepas, foram diluídas em água destilada estéril, etanol 77 % (V/V) ou PBS, na proporção de 1:10, de acordo com o método hahnemanniano dos frascos múltiplos (BRASIL, 2011; ABFH, 2007). Entre cada diluição as soluções foram submetidas a 100 dinamizações mecânicas, em ritmo vigoroso e constante [Figura 3], produzidas por braço mecânico modelo Denise® – AUTIC. Os bioterápicos utilizados neste projeto foram preparados nas concentrações de 10^{-12} (12DH) e 10^{-30} (30DH), sendo manipulados em condições assépticas, em cabine de segurança biológica classe II (AIRSTREAM®), a fim de evitar contaminações microbiológicas. Todas as soluções (estoques e bioterápicos) preparadas foram mantidas em frasco âmbar, ao abrigo da luz, sob refrigeração (4°C), sendo renovadas a cada 3 meses.

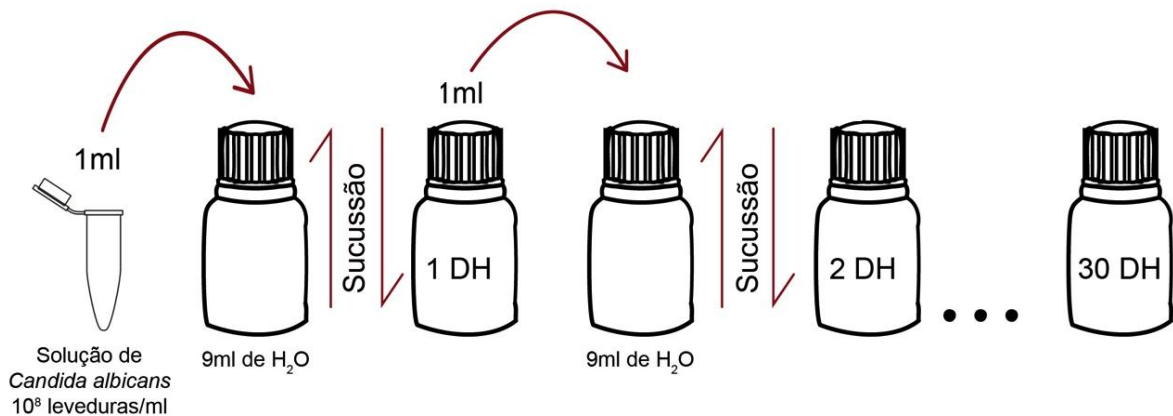


Figura 3: Esquema do preparo do bioterápico de *Candida albicans*. Como ponto de partida foi utilizado 1 ml de uma solução de leveduras de *C. albicans* na concentração de 10^8 leveduras/ml, a qual foi diluída em 9 ml do solvente. Após diluição as soluções foram sucussionadas mecanicamente por 100 vezes, obtendo-se assim a 1DH. Este procedimento foi repetido até a obtenção do bioterápico na potência 30DH (10^{-30}), sendo as soluções controle preparadas da mesma forma, exceto pela presença das leveduras.

3.5. Identificação das Leveduras Utilizadas para o Preparo dos Bioterápicos

3.5.1. Identificação Através da Utilização do CHROMagar®

Uma colônia foi retirada com alça descartável estéril de placas de agar nutriente, após o plaqueamento de 1 a 30DH e foi repicada em meio de isolamento e identificação de fungos, comercialmente denominado *Candida* CHROMagar® (Difco).

O preparo deste meio seguiu as orientações do fabricante, sendo acondicionado em placas de petri estéreis (RUIZ *et al.*, 2003). Estas placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias. As colônias de *C. albicans* crescem com uma cor verde-claro a verde médio.

3.5.2. Diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Das placas de *Candida* CHROMagar® foi retirada uma colônia, semeada em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar) a qual foi incubada por 48 horas a 37°C. Após este tempo, foi retirada uma colônia para repique em meio líquido de Sabouraud Dextrose, sendo a mesma incubada a 42°C, por 48 horas (ALVES *et al.*, 2002; SCHEID *et al.*, 2010). Sob estas condições a espécie *C. dubliniensis* não apresenta crescimento, enquanto a espécie *C. albicans* dá origem a colônias.

3.6. Avaliação dos Efeitos dos Solventes na Morfologia e Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e na Capacidade de Formação de Colônias de *C. albicans*

3.6.1. Avaliação Morfológica Por Contrastação Negativa

As primeiras dinamizações homeopáticas (1, 2 e 3 DH) diluídas em água destilada estéril, assim como a primeira dinamização (1DH) diluída em álcool 77% (V/V) foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, usando o método de contraste negativo. Para tanto, sobre uma pequena grade de cobre revestida com filme de formvar, foram individualmente depositados 5µl de cada amostra. Após 60 segundos, as amostras foram negativamente contrastadas com 5µl de solução aquosa de acetato de uranila 5%, à temperatura ambiente, por 1 minuto [Figura 4]. Ao final deste tempo, o excesso de material foi removido com papel de filtro e as amostras foram guardadas em dessecador até o momento da observação em microscópio eletrônico de transmissão (MORGANI/FEI). O mesmo procedimento foi seguido para a amostra controle composta por uma solução de *C. albicans* contendo 10⁷ leveduras/ml, diluída em PBS e em água destilada estéril. As análises morfológicas e a captura de imagens foram feitas por Venicio Feo da Veiga, Biólogo

responsável pelo Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ.

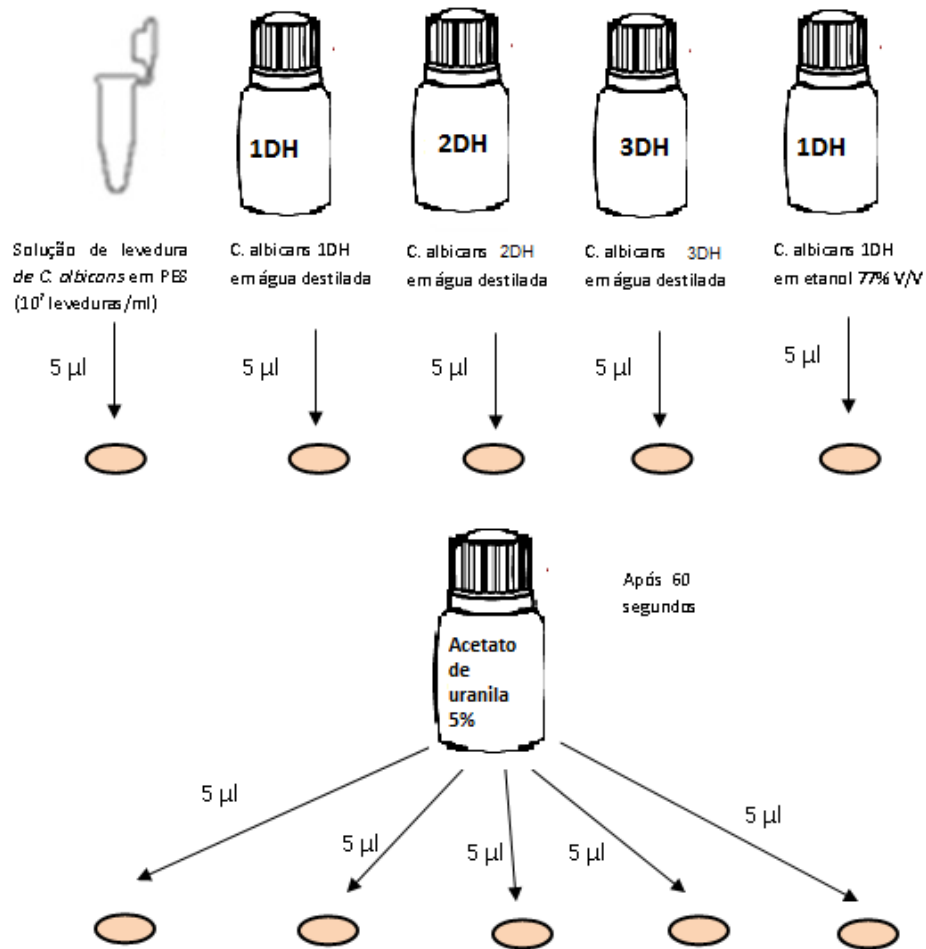


Figura 4: Esquema do preparo das grades de cobre revestidas com filme de formvar, utilizadas para avaliação morfológica em leveduras de *C. albicans* induzidas pelos diferentes solventes e pelas sucessivas dinamizações. Após contrastação com solução de acetato de uranila 5%, as grades foram guardadas em dessecador e posteriormente avaliadas por MET.

3.6.2. Avaliação de Ultraestrutura Celular

O efeito de diferentes solventes e da dinamização sobre a ultraestrutura de *C. albicans* foi avaliado em microscópio eletrônico de transmissão (MORGANI/FEI). Para este estudo, as seguintes amostras foram analisadas: bioterápico (1DH) preparado em água destilada estéril e em álcool 77% (V/V); suspensão contendo 10⁷ leveduras de *C. albicans* por ml de água destilada estéril (controle do solvente água, não sucussionado); suspensão contendo 10⁷ leveduras de *C. albicans* por ml de

álcool 77% (V/V) (controle do solvente álcool, não sucussionado); suspensão contendo 10^7 leveduras de *C. albicans* por ml de PBS (controle solvente PBS, não sucussionado). Após o preparo de cada uma das amostras, as mesmas foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M e sacarose a 0,2M, à temperatura ambiente por 2h, como descrito por VEIGA e colaboradores (2005). A pós-fixação foi realizada com ácido ósmico 1%. O material foi desidratado em banhos de acetona em séries crescentes de 30 a 100%. A polimerização foi feita em resina *Spurr*, em estufa à 60°C, por 48h. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo os quais foram colhidos em grades de 200 a 300 mesh. A contrastação foi realizada com acetato de uranila e citrato de chumbo (ISHIDA *et al.*, 2009), sendo os materiais posteriormente observados ao microscópio eletrônico (MORGANI/FEI) no Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ, por Venicio Feo da Veiga, Biólogo responsável.

3.6.3. Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

O efeito de diferentes solventes e da dinamização sobre a capacidade de formação de colônias foi avaliado por plaqueamento em ágar nutriente. Para tanto, da primeira (10^{-1}) à trigésima (10^{-30}) diluições dos bioterápicos foram retiradas alíquotas de 10 μ l para plaqueamento. Como solventes foram avaliados a água destilada estéril (dinamizadas e não dinamizadas) e o álcool 77% (V/V) sem dinamização. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e, em seguida, o número de unidades formadoras de colônias foi quantificado (BRAGA-SILVA *et al.*, 2010). A fim de viabilizar a contagem das UFC, as três primeiras dinamizações do bioterápico foram previamente diluídas em água destilada: 1DH (1:500); 2DH (1:100) e 3DH (1:10) [Tabela 1].

Tabela 1. Soluções analisadas, solventes e diluições utilizadas.

Soluções	Solvente	Diluição prévia ao plaqueamento
<i>Candida albicans</i> 1DH (10^{-1})	Água destilada estéril	1:500
<i>Candida albicans</i> 2DH (10^{-2})	Água destilada estéril	1:100
<i>Candida albicans</i> 3DH (10^{-3})	Água destilada estéril	1:10
<i>Candida albicans</i> 4DH (10^{-4})... 30DH (10^{-30})	Água destilada estéril	0
<i>Candida albicans</i> 1DH (10^{-1})	Álcool 77% (V/V)	0

3.7. Análises Físico-Químicas das Preparações Farmacêuticas

A solução de leveduras de *C. albicans* diluída em água destilada estéril, nas diluições de 10^{-12} (BIO 12DH) e 10^{-30} (BIO 30DH), foram submetidas às medidas de condutividade elétrica e pH. Foram feitos 3 experimentos independentes em duplicata. Para tanto, o aparelho foi devidamente calibrado para ambos os parâmetros e cerca de 8 ml, de cada solução, foram transferidos para tubos de vidro para análise no condutivímetro 227 MPC Mettler-Toledo. Os mesmos parâmetros foram avaliados para água destilada estéril e água dinamizada a 10^{-30} . Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25°C.

3.8. Quantificação da Presença de Leveduras de *C. albicans* nas várias Diluições Homeopáticas do Bioterápico

A quantificação da presença de leveduras de *C. albicans* nas várias diluições homeopáticas do bioterápico foi realizada através de dois métodos distintos: espectrofotometria e citometria de fluxo.

3.8.1. Espectrofotometria no Ultravioleta Visível

A absorvância de todas as preparações de bioterápicos de *C. albicans* (1DH a 30DH) foi medida em espectrofotômetro Biospectro SP – 22, usando o comprimento de onda de 530nm (CLSI, 2009). A água destilada foi usada como branco do equipamento. Uma solução contendo 10^7 leveduras de *C. albicans* foi igualmente analisada. Alíquotas de 2 ml foram transferidas para cubeta de quartzo

retangular para medidas de absorvância, à temperatura ambiente. Foram realizados 3 experimentos independentes em duplicata.

3.8.2. Citometria de Fluxo

Para estas análises, o número de leveduras contido em 1 ml das soluções 1DH a 30DH de *C. albicans* foi quantificado em citômetro de fluxo (FACScan). Para cada análise, as leituras foram feitas até que o volume original de 1 ml fosse reduzido a 500µl, sendo neste momento interrompida a contagem de eventos. O resultado foi expresso como a quantidade de leveduras presente em 1 ml de solução. A água destilada foi usada como solução controle. Sendo realizados 2 experimentos independentes.

3.9. Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Leveduras de *C. albicans* e Células Epiteliais MA104

A citotoxicidade dos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH foi avaliada frente às leveduras de *C. albicans* e às células MA104 utilizando diferentes metodologias, descritas a seguir.

3.9.1. Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Leveduras de *C. albicans*

A citotoxicidade foi avaliada através da quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e por citometria de fluxo (FACScan), utilizando iodeto de propídio (PI).

3.9.1.1. Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias

Para a quantificação das UFC uma suspensão de *C. albicans* contendo 10^5 leveduras/ml foi incubada em meio líquido de YCB contendo 10% de BSA a 0,01%, na presença, ou na ausência, das formulações farmacêuticas, em constante agitação, por 48 horas, a 37°C. Terminada a incubação, as leveduras de cada grupo experimental foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada (PBS). Em seguida, foram realizadas diluições em água destilada estéril, necessárias para o plaqueamento em ágar nutriente, feito em placas de petri, para quantificação do

número de UFC, conforme protocolo previamente estabelecido (BRAGA-SILVA *et al.*, 2010). Os seguintes grupos experimentais foram avaliados: (G1) Suspensão celular em YCB + BSA; (G2) Suspensão celular incubada com 10% de BIO 12DH; (G3) Suspensão celular incubada com 10% de BIO 30DH; (G4) Suspensão celular incubada com 10% do veículo das formulações (água destilada estéril dinamizada); (G5) Suspensão celular incubada com Anfotericina B a 0,500 µg/ml. A escolha da concentração de Anfotericina B foi determinada a partir de um ensaio preliminar onde o antifúngico Anfotericina B (Cristália Laboratório Químico Farmacêutico) foi preparado na concentração de 50 mg/10ml, usando água destilada estéril como solvente. Esta solução-mãe foi novamente diluída na proporção de 1:100, gerando uma solução na concentração de 50 µg/ml, a qual foi submetida a diluições seriadas, nas concentrações de: 2, 1, 0,5 e 0,250 µg/ml. A suspensão de 10^5 leveduras/ml em meio líquido de YCB, contendo 1% de BSA, foi incubada em cada uma destas diluições de Anfotericina, em constante agitação, por 48 horas a 37°C. Como controle, a mesma suspensão de *C. albicans* foi preparada e submetida às mesmas condições experimentais, exceto pela presença da Anfotericina B. Terminada a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificado para cada situação experimental.

3.9.1.2. Avaliação da Citotoxicidade dos Bioterápicos por Citometria de Fluxo

Este ensaio de citometria de fluxo utilizou o iodeto de propídio que é um corante fluorescente capaz de se intercalar entre as bases nitrogenadas do DNA de células não viáveis (BARBOSA, 2011). Foram avaliadas a citotoxicidade de quatro concentrações diferentes dos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, a saber: 1, 5, 10 e 20% frente à suspensão de leveduras de *C. albicans* (10^6 leveduras/ml) incubadas a 37°C, por 48 horas sob constante agitação. Considerando a concentração de 10%, os bioterápicos foram incubados com as suspensões de *C. albicans* contendo 10^6 leveduras/ml em doses fracionadas e não fracionada. As seguintes situações experimentais foram avaliadas: (G1) Suspensão celular em YCB + BSA; (G2) Suspensão celular incubada com diferentes concentrações de BIO 12DH; (G3) Suspensão celular incubada com diferentes concentrações de BIO 30DH; (G4)

Suspensão celular incubada com o solvente das formulações (água destilada estéril) nas diferentes concentrações; (G5) Suspensão celular incubada com o veículo das formulações nas diferentes concentrações (água destilada estéril dinamizada); (G6) Suspensão celular de *C. albicans* contendo 10^6 leveduras/ml autoclavada (controle de células mortas). Para avaliar o efeito do fracionamento da dose de bioterápicos frente à incorporação do PI, utilizamos uma única concentração de bioterápico, a saber, 10% (V/V), para um volume total de 1 ml. No caso do fracionamento da dose, cada alíquota do respectivo bioterápico foi adicionada com intervalos de pelo menos 40 minutos. Desta forma, considerando 24 horas de incubação com os bioterápicos, adicionamos todo o volume de bioterápico (1ml) de uma única vez ou em 3 alíquotas de 333 μ l; em contrapartida, para os tempos de 48 e 72 horas, a dose de 1ml foi fracionada em 6 alíquotas de 170 μ l e 9 alíquotas de 112 μ l, com intervalos de 40 minutos entre as alíquotas. Ao final de cada incubação específica, foi realizado o procedimento de lavagem das leveduras com PBS, para remoção do meio e dos bioterápicos, com posterior incubação por até 5 minutos com PI (concentração 10 μ l/ml). Todas as amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACScan) considerando um total de 10.000 eventos por amostra.

3.9.2. Avaliação da Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Células MA104

A citotoxicidade de BIO 12DH e BIO 30DH nas concentrações de 1, 10 e 20% frente às células MA104 foi avaliada pelo ensaio com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), seguindo protocolo previamente validado (AQUINO *et al.*, 2008). As suspensões da linhagem epitelial de rim de macaco, linhagem MA104, contendo 10^5 células/ml foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, na presença ou na ausência dos bioterápicos e respectivos controles, por 24 horas, a 37°C. Ao final desta incubação, foram acrescentados 20 μ l de MTT (SIGMA, 5mg/ml) a cada poço, sendo esta reação feita por 3 horas a 37°C, na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada (1100 rpm/7min), o sobrenadante removido e os cristais de MTT solubilizados em 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). As respectivas absorbâncias foram determinadas em leitor de microplacas (TP – Reader – Thermo Plate), em comprimento de onda

de 630 nm, como descrito por Mosmann (1983). A citotoxicidade dos bioterápicos foi avaliada frente à suspensão de células MA104 (10^5 células/ml) para as seguintes situações experimentais: (GCC) Suspensão celular em DMEM (grupo controle); (GA) Suspensão celular tratada com água destilada; (GA30) Suspensão celular incubada com o veículo das formulações (água destilada estéril dinamizada); (G12) Suspensão celular incubada com BIO 12DH; (G30) Suspensão celular incubada com BIO 30DH.

3.10. Quantificação do Índice de Adesão de *Candida albicans* às Células MA104

A quantificação do índice de adesão de *C. albicans* às células MA104 foi feita por citometria de fluxo (FACScan). Para tanto, as células MA104 (5×10^4 células/ml) foram pré-incubadas em garrafas de cultura, por 18 dias, a 37°C , com BIO 12DH e BIO 30DH, preparados a partir de leveduras das cepas: ATCC[®] 10231[™] e C11. Adicionalmente, foi preparado um bioterápico a partir das hifas de *C. albicans*. A formação de hifas foi induzida a partir de leveduras de *C. albicans* incubadas sob agitação, a 37°C , por 6 horas em SFB. Os bioterápicos foram substituídos por novas soluções a cada dois dias, na concentração de 10 % (V/V). A manutenção das culturas por até 18 dias envolveu a tripsinização das mesmas, duas vezes por semana, sendo as células repicadas sempre na mesma concentração (5×10^4 células/ml), a fim de garantir uma relação bioterápico/célula constante. Como controles do experimento, células MA104 (5×10^4 células/ml) foram incubadas com água destilada estéril dinamizada, não dinamizada e em meio de cultura DMEM. No 17º dia, as culturas de células foram tripsinizadas sendo 3 ml destas suspensões, contendo 5×10^5 células/ml, transferidos para placas de cultura de 6 poços. Esta placa foi novamente incubada, com as respectivas soluções teste, por mais 24h, a 37°C . A suspensão de leveduras foi preparada na concentração de 5×10^6 leveduras de *C. albicans* por ml sendo a mesma incubada, à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 10 minutos, com 1 ml de uma solução de FITC (isotiocianato de fluoresceína – 0,5mg/ml). Ao final, esta suspensão fúngica foi lavada duas vezes com PBS para remoção do FITC, ressuspensa em DMEM sem soro, sendo 3 ml

desta suspensão adicionada a cada poço contendo as células epiteliais MA104 (5×10^5 céls/ml). Esta incubação foi feita por 1 hora e 30 minutos, a 37°C , ao abrigo da luz. Em seguida, as células MA104 foram lavadas com PBS para remoção das leveduras não aderidas, fixadas com solução de paraformaldeído 4%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, removidas mecanicamente com auxílio de *scrapers* e ressuspensas em 500 μl de PBS. A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo, para um total de 10.000 eventos, lidos no canal FL – 1. Os valores lidos foram utilizados para o cálculo do índice de adesão das leveduras às células epiteliais.

3.11. Respirometria de Alta Resolução de Células Epiteliais MA104

A respirometria de alta resolução foi o método empregado para a avaliação dos efeitos na função mitocondrial e no metabolismo oxidativo das células MA104, sob a influência do tratamento com BIO 12DH e BIO 30DH, na concentração de 10%. Os resultados obtidos foram comparados aqueles obtidos com os grupos controles (células tratadas com água destilada estéril dinamizada e não dinamizada). Para tanto, uma suspensão celular contendo 5×10^4 células/ml foi cultivada em meio de cultura suplementado (DMEM + SFB) e estimulada com 3 a 4 alíquotas das soluções teste, com intervalos de pelo menos uma hora e meia entre cada alíquota, no mínimo 6 e no máximo 18 vezes. Ao término de cada tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e para cada situação experimental, a concentração de células foi ajustada para 5×10^5 células/ml. Os parâmetros da respiração das células MA104 foram avaliados, em tempo real, em câmara hermeticamente fechada de oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-O2K), sendo comparada à variação da concentração de oxigênio no interior da câmara, em relação ao consumo de oxigênio de cada situação experimental. Os seguintes inibidores da fosforilação oxidativa foram adicionados às suspensões celulares no interior da câmara do oxígrafo: 4 μl de Oligomicina A (1mg/ml), inibidor da ATP sintase; titulação com 1 μl de FCCP (cianeto de carbonilo- 4 - (trifluorometoxi) fenilhidrazona) 0,1 mM, desacoplador mitocondrial que avalia a capacidade respiratória máxima; 2 μl de KCN 0,1M, inibidor da citocromo oxidase, que mede o consumo de

oxigênio residual, ou seja não mitocondrial (GNAIGER, 2011; COSTA *et al.*, 2012; SIQUEIRA, 2013; TEIXEIRA, 2013).

3.12. Efeito dos Bioterápicos Sobre os Macrófagos RAW 264-7

3.12.1. Citotoxicidade Frente às células RAW 264-7

A citotoxicidade dos bioterápicos (BIO 12DH e BIO 30DH), tratados no mínimo 6 vezes na concentração de 10%, foi avaliada pelo ensaio com MTT. O método mede a atividade mitocondrial das células viáveis possibilitando a avaliação da viabilidade e a atividade celular como já descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). A redução do MTT pela ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase das células viáveis leva formação de cristais de formazam. Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade destes cristais e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a atividade mitocondrial dos macrófagos nas diferentes situações experimentais (MOSMANN, 1983). As suspensões de células da linhagem de macrófagos RAW 264-7 contendo 5×10^6 cels / ml foram colocadas em placas de 96 poços e tratadas com BIO 30DH, água 30DH e água destilada estéril. Estes dois últimos, foram os controles do experimento. Após a retirada do sobrenadante para avaliação da produção de óxido nítrico, os macrófagos foram incubados com 20 μ l de MTT (5,0 mg / ml em PBS), por 3 horas, a 37°C, na ausência de luz. Em seguida, os sobrenadantes, após centrifugação, foram desprezados e substituídos por 200 μ l de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA. Foram realizados três experimentos independentes, em quintuplicata, utilizando os macrófagos tratados por 4 vezes durante 48 horas.

3.12.2. Dosagem de Óxido Nítrico Produzido por macrófagos RAW 264-7

Nestas análises os macrófagos da linhagem RAW 264-7 foram plaqueados em meio DMEM suplementado com 10% com SFB em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^6 células/ml. Após incubação por 24 horas, a 37°C, as células não aderentes foram removidas, o meio de cultura renovado, permitindo que os macrófagos aderentes fossem estimulados com BIO 30DH e respectivos controles

(água 30DH, água destilada estéril e células isentas de tratamento). O tratamento com as soluções testes (bioterápico e controles) foi feito utilizando 4 alíquotas de 100 µl por 48 horas, a 37⁰C. Em seguida, os macrófagos foram ativados com 100 ng/ml de lipopolissacarídeo (LPS) por 24 horas, a 37⁰C. Após ativação, os sobrenadantes de cada situação experimental foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, sendo adicionados, a cada um dos poços, 100 µl do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, dicloreto de naftiletieno diamina 0,1% e H₃PO₄ 10%), à temperatura ambiente. A concentração de nitrito foi calculada através da curva padrão de nitrito de sódio, utilizando-se as seguintes concentrações: 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 250 µg/ml. O óxido nítrico produzido, em cada situação experimental, foi avaliado através da leitura em leitor de ELISA em 540 nm, sendo a quantidade de óxido nítrico produzida calculada em função da curva padrão de nitrito de sódio (GREEN *et al.*, 1982).

3.13. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados analisados através do método ANOVA (análise de variância). Sendo considerados estatisticamente significativos os valores de *p* menores que 0,05.

4. Resultados

4.1. Preparo dos Bioterápicos de *Candida albicans*

Os bioterápicos de *Candida albicans* foram preparados a partir de uma suspensão de leveduras (cepa 11 e ATCC[®] 10231[™]), na concentração de 1×10^8 células/ml, seguindo a farmacotécnica homeopática descrita na Farmacopeia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011). O método de preparo foi adaptado daquele previamente descrito pelo médico homeopata Roberto Costa, tendo sido utilizada água destilada estéril e soro fisiológico, como previamente descrito por Roberto Costa. Os bioterápicos testados foram BIO 12DH (10^{-12}) e BIO 30DH (10^{-30}), após identificação e certificação da pureza da cepa de *C.albicans* utilizada como matriz para a preparação dos bioterápicos.

4.1.1. Identificação das Leveduras de *C. albicans*

4.1.1.1. Através do Uso do CHROMagar[®]

A identificação da espécie *C. albicans* de ambas as cepas (ATCC[®] 10231[™] e C11) utilizadas para o preparo dos bioterápicos foi feita utilizando meio *Candida* CHROMagar. Considerando que o meio *Candida* CHROMagar possui substratos artificiais (cromogênios) que liberam compostos de várias cores a partir da degradação de enzimas específicas, o plaqueamento neste meio permite a detecção ou diferenciação das espécies de *Candida*, da seguinte forma: colônias de *C. albicans* produzem uma cor verde-claro a verde médio; colônias de *C. tropicalis* formam colônias azuis; *C. krusei* dão origem a colônias rosas; *C. dubliniensis* colônias verdes escuras. O plaqueamento dos bioterápicos 1DH a 5DH deu origem a colônias de coloração verde indicando que os mesmos seriam compostos por *C. albicans* ou *C. dubliniensis* [Figura 5 a,b,c].

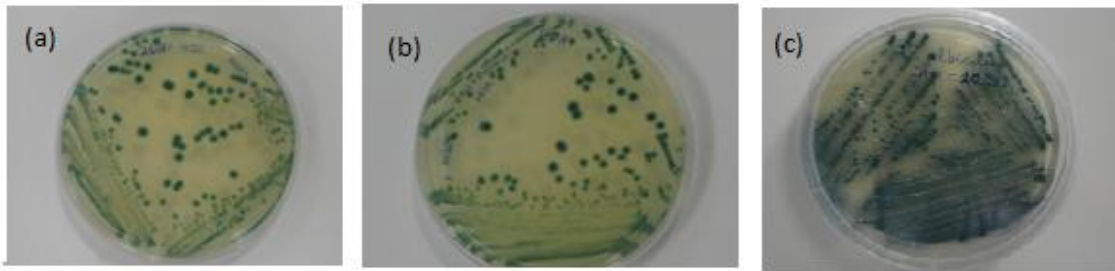


Figura 5: Placas representativas da cultura de bioterápicos em meio *Candida* CHROMagar®. (a) Colônias extraídas do plaqueamento do bioterápico 1DH (cepa 11); (b) Colônias extraídas do plaqueamento do bioterápico 5DH (cepa 11); (c) Colônias extraídas do plaqueamento do bioterápico 1DH (cepa ATCC® 10231). A coloração verde identifica a espécie *C. albicans*.

4.1.1.2. Diferenciação entre *C. albicans* e *C dublinienses* das Colônias Formadas no CHROMagar®

O repique das colônias retiradas das placas de CHROMagar (C11 e ATCC® 10231), feito em meio de cultura BDA (Agar Dextrose Batata), seguido de repique em Sabouraud, confirmou, após incubação a 42°C por 48 horas, que os bioterápicos eram compostos exclusivamente por *C. albicans*, uma vez que houve crescimento de colônias.

4.2. Efeitos dos Solventes na Morfologia, Ultraestrutura e Capacidade de Formação de Colônias de *C. albicans*

4.2.1. Avaliação Morfológica pelo Método de Contrastação Negativa

Imagens obtidas por contrastação negativa indicaram que os solventes, PBS e água destilada estéril preservaram a morfologia das leveduras de *C. albicans* [Figuras 6 A e B]. Da mesma forma, as sucessivas sucussões usadas na produção dos bioterápicos não foram capazes de induzir alterações na morfologia das leveduras até a terceira diluição e sucussão, preservando a integridade e morfologia celulares [Figura 7 A – C]. Em contra partida, a manipulação dos bioterápicos em álcool 77% (V/V), induziu drásticas alterações morfológicas, indicando que o solvente provavelmente danificou a parede da levedura e extraiu parte da membrana celular fúngica, causando perda de conteúdo citoplasmático [Figura 8].

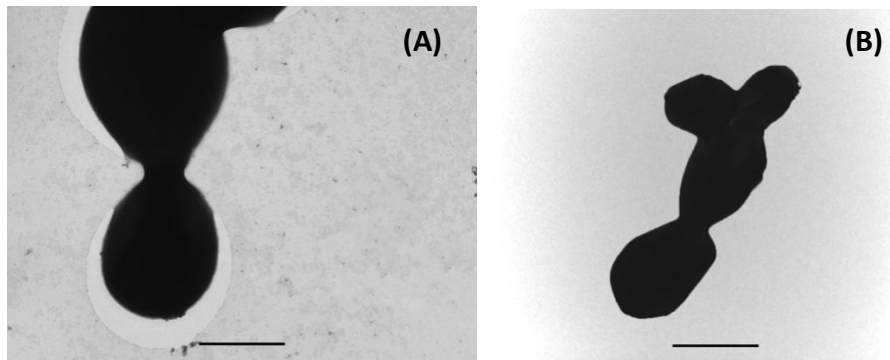


Figura 6: (A) Leveduras de *C. albicans* em PBS. (B) Leveduras de *C. albicans* água destilada estéril. Barra de aumento: 2 μ m.

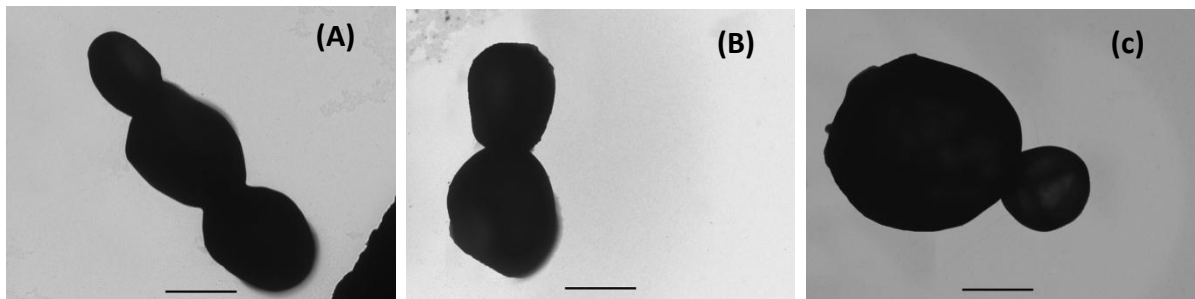


Figura 7: (A) Levedura de *C. albicans* presente no bioterápico 1DH. (B) Levedura de *C. albicans* presente no bioterápico 2DH. (C) Levedura de *C. albicans* presente no bioterápico 3DH. Barra de aumento: 2 μ m.

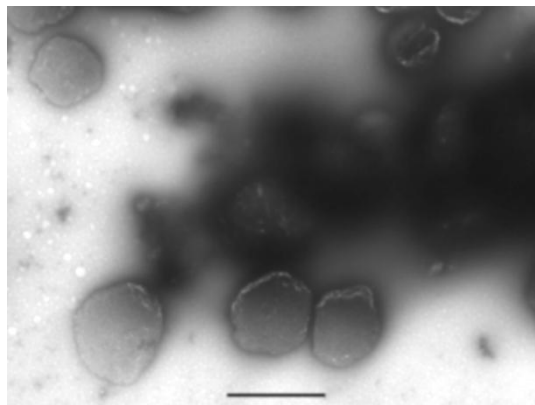


Figura 8: Leveduras de *C. albicans* 1DH em etanol 77% (V/V). Barra de aumento: 1 μ m.

4.2.2. Análise da Ultraestrutura Celular

A ultraestrutura de leveduras e dos bioterápicos de *C. albicans* foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MORGANI/FEI). Foram preparadas as seguintes amostras, seguindo protocolo descrito em material e métodos:

bioterápicos manipulados em álcool 77% (V/V) e em água destilada estéril, dinamizados (1DH) e não dinamizados; suspensão de *C. albicans* (10^7 leveduras/ml) em PBS (controle não dinamizado). As imagens obtidas indicaram que as ultraestruturas foram semelhantes nas preparações manipuladas em água destilada dinamizada e não dinamizada [Figura 9 A e B], assim como a situação controle (PBS) [Figura 9 C]. Verificamos, desta forma, que o procedimento de dinamização, assim como o uso de diferentes solventes (água e PBS) preservaram as membranas e paredes celulares, assim como as estruturas citoplasmáticas das leveduras. Em contrapartida o uso de álcool 77 % (V/V) como diluente das leveduras causou danos à parede celular (setas), desorganização das estruturas citoplasmáticas e perda do formato arredondado, de maneira independente da dinamização [Figura 10 A – B].

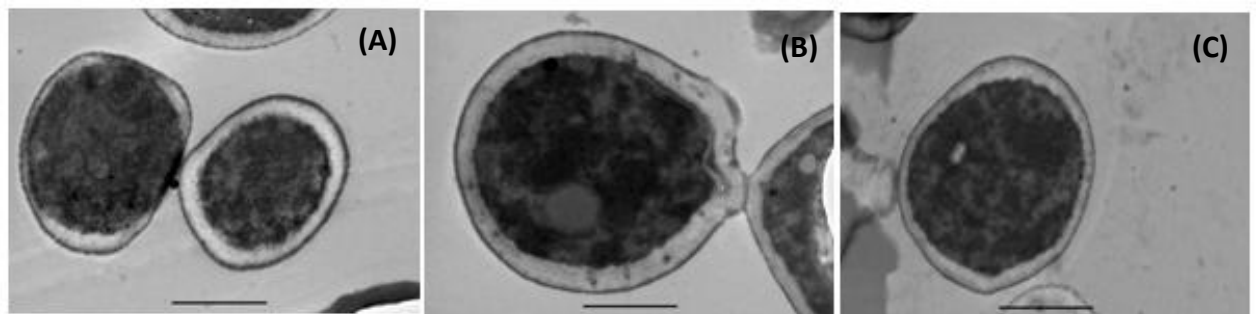


Figura 9: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). (A) Leveduras de *C. albicans* em água destilada não dinamizada. (B) Leveduras de *C. albicans* 1DH em água destilada estéril. (C) Leveduras de *C. albicans* (10^7 leveduras/ml) em PBS (controle não dinamizado). Barras de aumento: $2\mu\text{m}$

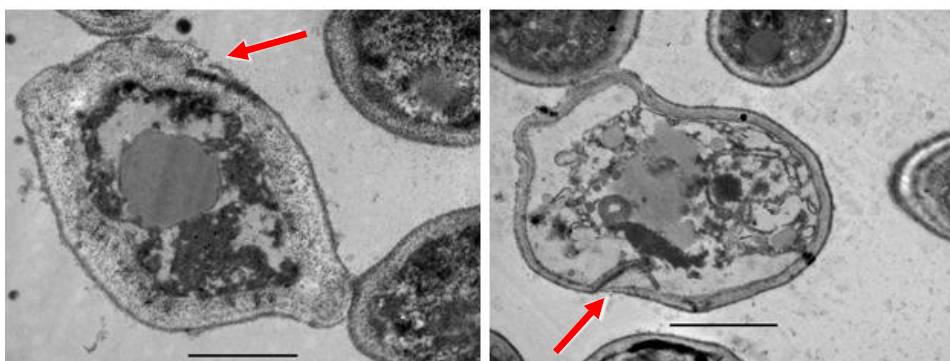


Figura 10: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). (A) Leveduras de *C. albicans* 1DH em álcool 77% (V/V). (B) Leveduras de *C. albicans* diluídas em álcool 77% (V/V). Barra de aumento: $2\mu\text{m}$.

4.2.3. Quantificação do Número de Unidades Formadoras de Colônias

A quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas várias preparações homeopáticas de *C. albicans* (cepa C11) indicou que é possível quantificar o número de UFC nas diluições de 1DH até a 5DH, de maneira proporcional às respectivas diluições. A Tabela 2 indica o número de UFC e a correspondência com o número de leveduras/ml, para cada diluição plaqueada. Observado ainda, que há crescimento proporcional às respectivas diluições até a 4DH. A partir da 5DH tal correspondência não existe mais, sendo impossível quantificar a presença de leveduras nos plaqueamentos a partir da 6DH. Observa-se também ausência de crescimento quando a suspensão de *C. albicans* 1DH é preparada em álcool 77 % V/V, indicando que o mesmo induziu lise celular completa.

Tabela 2: Quantificação de UFC nas Diluições Plaqueadas dos Bioterápicos.

Dinamização	Solvente	Nº de UFC	Nº de leveduras/ml
1DH (10^{-1})	Água destilada	174	1×10^7
2DH (10^{-2})	Água destilada	129	$1,3 \times 10^6$
3DH (10^{-3})	Água destilada	116	$1,2 \times 10^5$
4DH (10^{-4})	Água destilada	79	$0,8 \times 10^4$
5DH (10^{-5})	Água destilada	2	$0,2 \times 10^3$
6DH ... 30DH	Água destilada	0	0
1DH (10^{-1})	Álcool 77% (V/V)	0	0

Adicionalmente, as respectivas placas de cultura foram fotografadas a fim de ilustrar o crescimento das colônias nas diluições 1DH a 6DH [Figura 11 A – F], considerando ambos os solventes testados (álcool e água destilada).

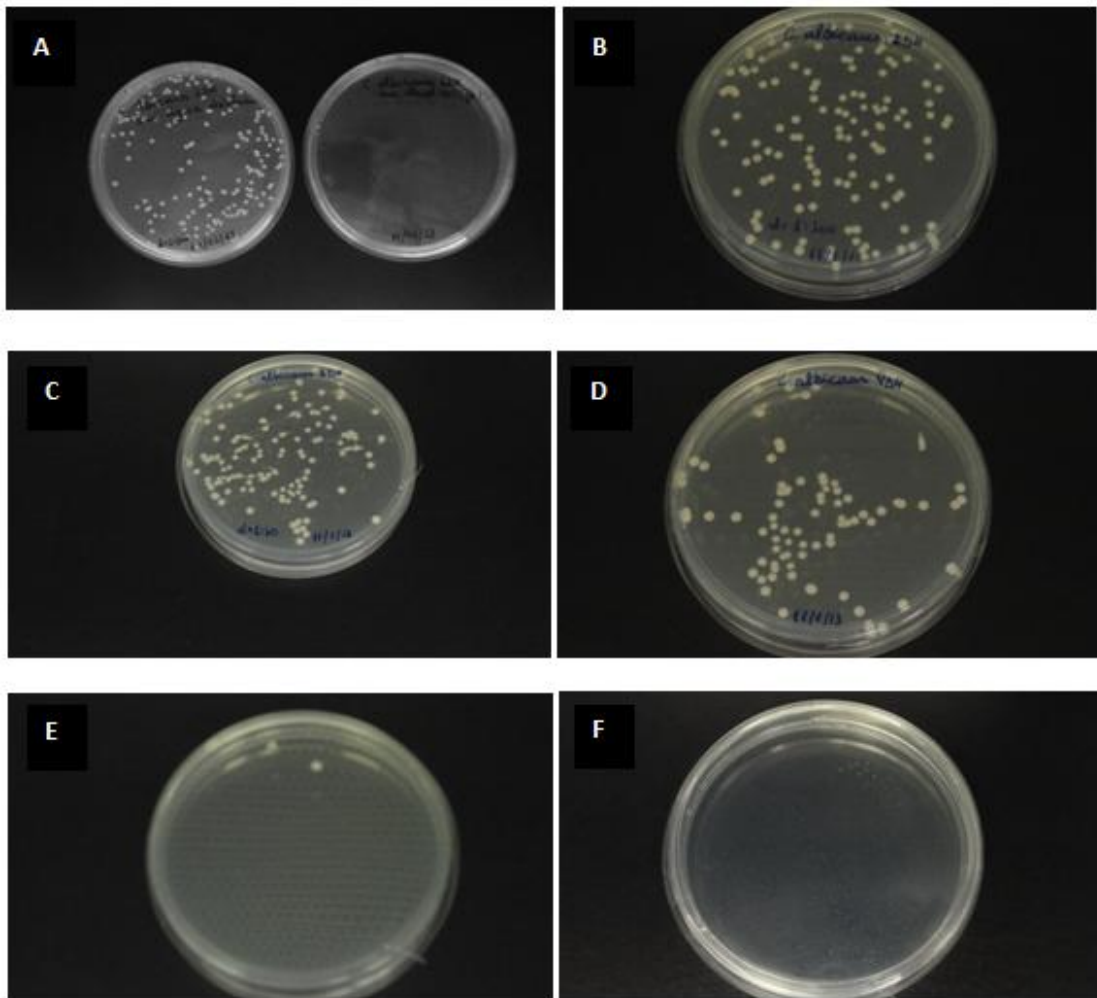


Figura 11: (A): Placa à esquerda, *C. albicans* 1DH em água destilada estéril contendo 1×10^7 leveduras/ml. Placa à direita, *C. albicans* 1DH em solução alcoólica 77% (V/V) indicando ausência de crescimento. (B) *C. albicans* 2DH contendo $1,3 \times 10^6$ leveduras/ml. (C): *C. albicans* 3DH contendo $1,2 \times 10^5$ leveduras/ml. (D): *C. albicans* 4DH contendo $0,8 \times 10^4$ leveduras/ml. (E): *C. albicans* 5DH contendo $0,2 \times 10^3$ leveduras/ml. (F): *C. albicans* 6DH indicando ausência de crescimento.

4.3. Análises Físico-Químicas dos Bioterápicos

A condutividade elétrica e as medidas de pH foram realizadas logo após o preparo das formulações farmacêuticas em conformidade com protocolo descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Para estas determinações foi utilizado um condutivímetro 227 MPC Mettler-Toledo. Os resultados apresentados são referentes às análises de BIO 12DH, BIO 30DH. Como controles, foram avaliados os mesmos parâmetros considerando água destilada estéril e água destilada estéril dinamizada (30DH). A Tabela 3 expressa a média dos resultados de três independentes (n=3)

realizados à temperatura de 25°C. Os resultados obtidos indicam aumento da condutividade elétrica em todas as soluções dinamizadas em relação ao controle.

Tabela 3: Valores das Leituras de Condutividade e pH das Várias Amostras.

Soluções	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH
Água	$4,77 \pm 0,40$	$5,32 \pm 0,40$
Água 30DH	$17,15 \pm 1,00$	$6,18 \pm 0,44$
BIO 12DH	$12,60 \pm 0,85$	$5,57 \pm 0,49$
BIO 30DH	$12,42 \pm 0,82$	$6,08 \pm 0,11$

4.4. Quantificação da Presença de Leveduras de *C. albicans* nas Diluições Homeopáticas dos Bioterápicos

4.4.1. Espectrofotometria no Ultravioleta Visível

Por espectrofotometria no UV visível, utilizando o comprimento de onda 530 nm, foram analisadas as várias amostras de *C. albicans*, sendo estas absorvâncias comparadas àquela obtida com a água destilada. As seguintes amostras foram lidas: *C. albicans* $10^7/\text{ml}$ (não sucussionada); bioterápicos nas diluições de 30DH, 25DH, 20DH, 15DH, 12DH, 10DH, 5DH, 4DH, 3DH, 2DH, 1DH [Figura 12]. Os resultados obtidos indicaram que há absorvância significativa ($p < 0,05$) apenas para a suspensão de leveduras contendo $10^7/\text{ml}$ (D.O. = 0,277) e para o bioterápico 1DH (D.O. = 0,293). As demais amostras produziram valores muito próximos, sem diferença estatística, quando comparados ao controle água destilada. Foram realizadas três leituras independentes para cada amostra.

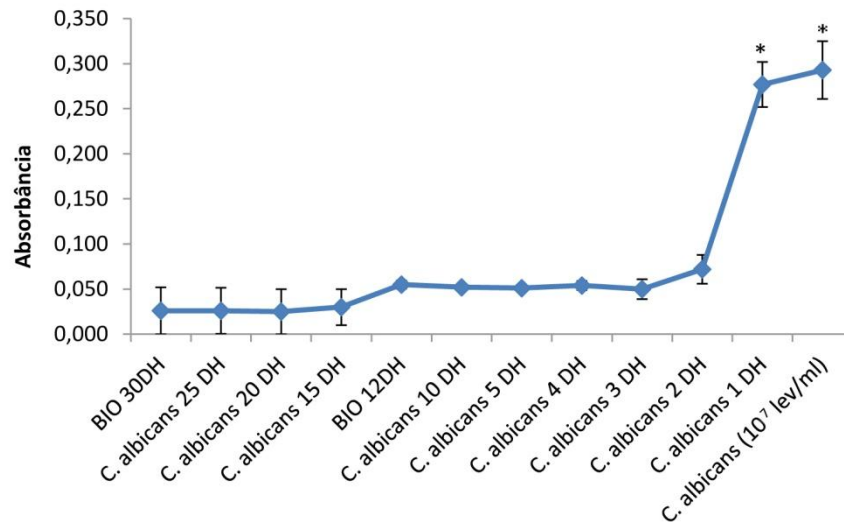


Figura 12: Determinação da absorvância das soluções dinâmicas de *C. albicans* (n = 3). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as absorvâncias das demais soluções dinâmicas em relação ao controle água destilada. Observada diferença estatisticamente significativa para a suspensão de leveduras contendo 10^7 células/ml (não sucussionada) e para o bioterápico 1DH, com análise estatística realizada por ANOVA, *p < 0,05.

4.4.2. Citometria de Fluxo das Soluções Dinâmicas

O número de leveduras/ml foi calculado a partir do número de eventos contados em 500 μ l das várias amostras de bioterápicos (1 a 30DH) em citômetro de fluxo (FACScan). O primeiro tubo lido continha apenas água destilada estéril, sendo as leituras posteriores feitas a partir das soluções mais diluídas (30DH) até as mais concentradas, contendo 10^7 leveduras / ml, a fim de evitar possíveis interferências [Figura 13]. Os resultados obtidos indicaram quantidades detectáveis de leveduras ou fragmentos de *C. albicans* até a terceira diluição (3DH), enquanto que a análise por espectrofotometria indicou presença de material celular capaz de absorver no UV visível, apenas na primeira diluição (1DH). Em contrapartida a quantificação do número de UFC detectou a presença de unidades formadoras de colônias, quando as amostras de bioterápicos 1DH até a 5DH foram plaqueadas. Tais resultados sugerem que dependendo da sensibilidade e da metodologia empregadas é possível detectar material biológico no máximo até a 5DH. Desta forma, comprovamos que as preparações BIO 12DH e BIO 30DH não apresentam infectividade, uma vez que o processo de ultradiluição sucessiva levou à inativação do material.

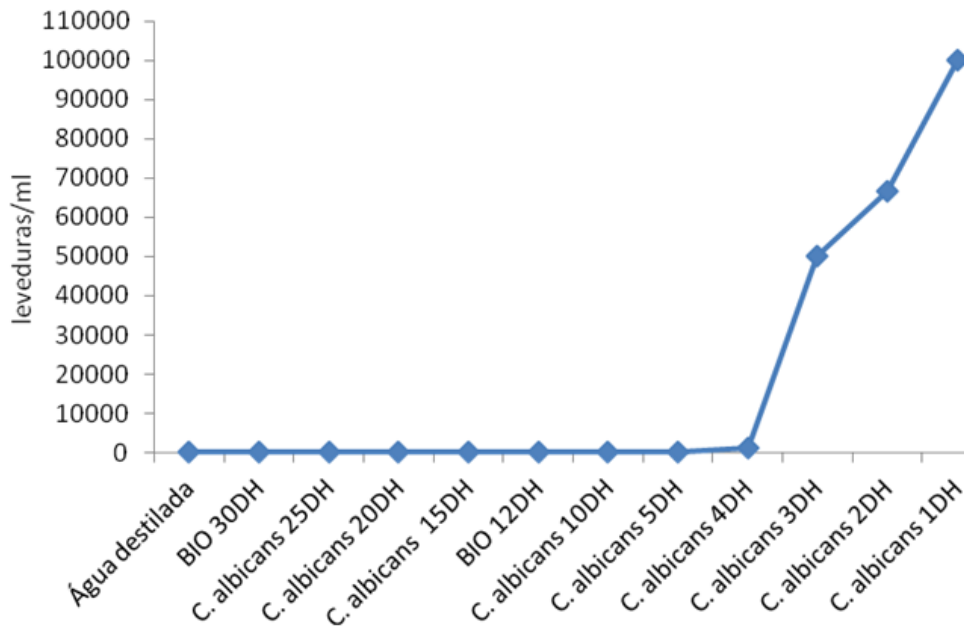


Figura 13: Quantificação por citometria de fluxo do número de leveduras/ml nas soluções de *C. albicans* (n = 2). A água destilada foi usada como controle.

4.5. Citotoxicidade dos Bioterápicos

4.5.1. Frente às leveduras de *C. albicans*

4.5.1.1. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias

Para a realização deste experimento, avaliamos diferentes concentrações de Anfotericina B frente à cepa 11 de *C. albicans*. As seguintes concentrações foram testadas: 0,250 µg/ml, 0,500 µg/ml, 1,00 µg/ml e 2,00 µg/ml (ANDREU, 2007). A Figura 14 representa os valores percentuais de viabilidade obtidos após 48 horas de incubação, a 37°C, em agitação constante. Foram feitos três experimentos independentes, em duplicata. Verificamos que a partir da concentração de 0,500 µg/ml o percentual de viabilidade celular foi igual a zero. Após determinação do CIM de Anfotericina B, a citotoxicidade dos bioterápicos foi avaliada por UFC, utilizando para tanto, os seguintes grupos experimentais: (G1) Suspensão celular em YCB + BSA; (G2) Suspensão celular incubada com 10% de BIO 12DH; (G3) Suspensão celular incubada com 10% de BIO 30DH; (G4) Suspensão celular incubada com

10% do veículo das formulações (água destilada estéril dinamizada); (G5) Suspensão celular incubada com Anfotericina B a 0,500 µg/ml.

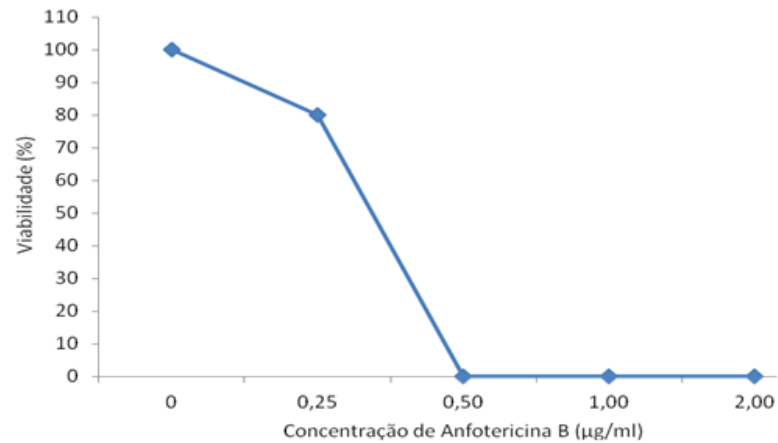


Figura 14: Avaliação da CIM de Anfotericina B frente à leveduras de *C. albicans* (cepa 11).

A viabilidade celular das leveduras foi calculada através da média de três experimentos ($n = 3$) realizados em duplicata e representados na Figura 15. Os resultados indicaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre todas as situações experimentais testadas em relação ao controle, inclusive no grupo tratado com a água destilada estéril não dinamizada, o que pode ser atribuído ao efeito da osmolaridade sobre as leveduras de *C. albicans*. Adicionalmente, observamos diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular do grupo tratado com água destilada e os tratados com as soluções dinamizadas: água dinamizada ($p = 0,02$), BIO 12DH ($p = 0,006$) e BIO 30DH ($p = 0,05$).

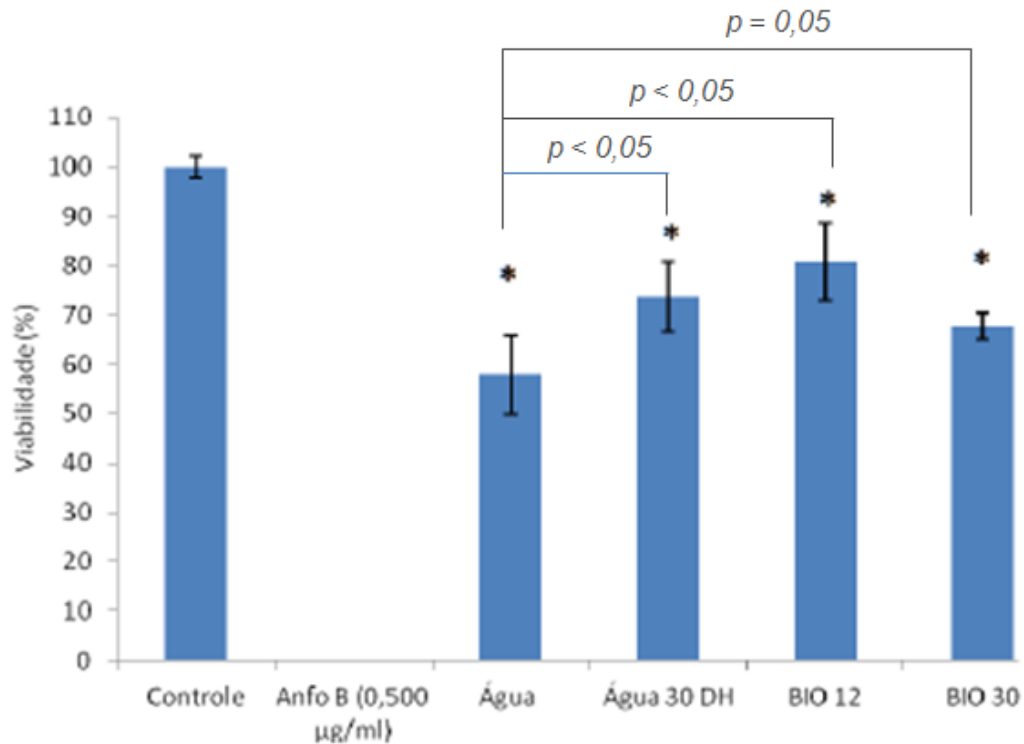


Figura 15: Viabilidade de leveduras de *C. albicans* frente às diferentes situações experimentais. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Análise estatística One-way (ANOVA).

4.5.1.2. Viabilidade Celular Avaliada por Citometria de Fluxo em Variadas Concentrações dos Bioterápicos

A viabilidade celular de leveduras de *C. albicans* foi avaliada após incubação com BIO 12DH e BIO 30 DH, nas concentrações de 1, 5, 10 e 20% (V/V), em relação ao meio de cultura. Para tanto, utilizamos o método de incorporação com iodeto de propídio e leituras em citometria de fluxo FACScan (FL – 2). Como controles, utilizamos duas suspensões contendo 10^6 leveduras/ml, sendo uma destas contendo células viáveis e a outra contendo leveduras mortas por autoclavação. Após incubação por 48 horas, a 37°C e adição de PI, verificamos que a viabilidade celular dos grupos tratados com BIO 12DH e 30DH não foi afetada, independente das concentrações testadas, quando comparados aos controles (água dinamizada; água destilada; suspensão de leveduras) [Figura 16].

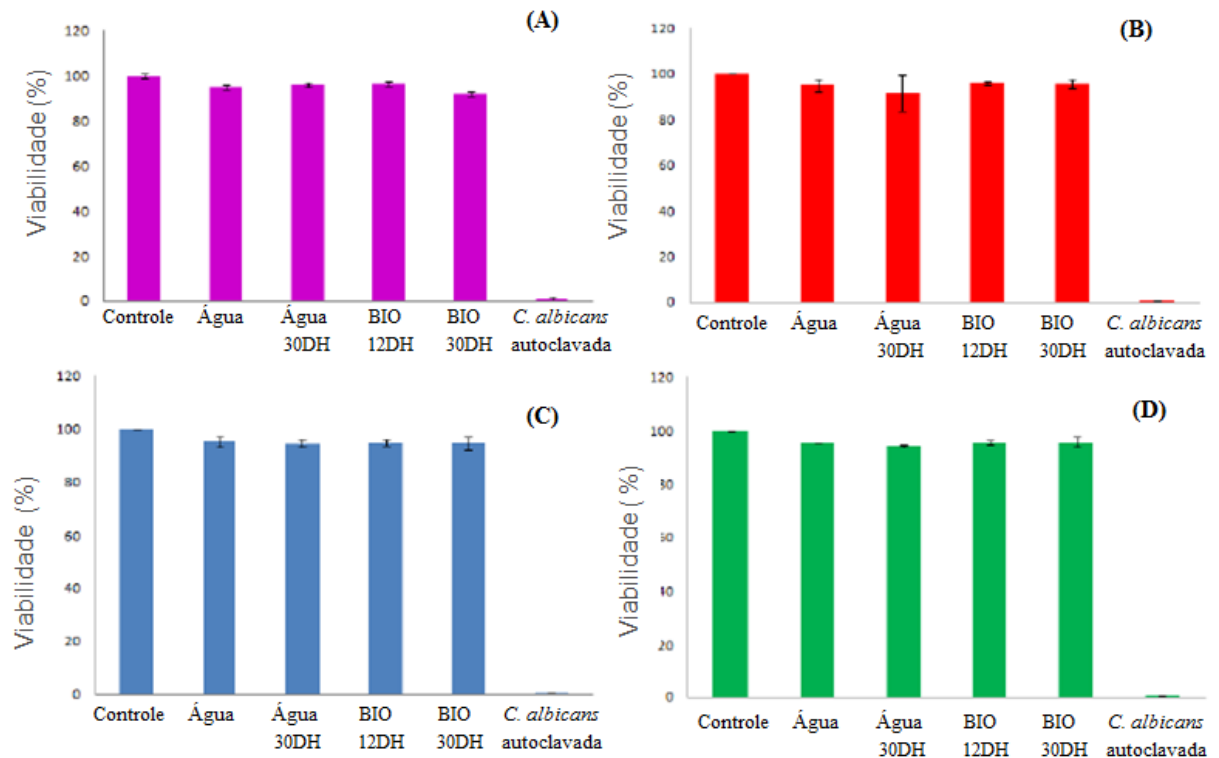


Figura 16: Citometria de fluxo de suspensão de leveduras de *C. albicans* (10^6 leveduras/ml) incubadas por 48 horas, a 37°C com diferentes concentrações de água, água 30DH, BIO 12DH e BIO 30DH. (A) Incubação a 1%. (B) Incubação a 5%. (C) Incubação a 10%. (D) Incubação a 20%. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e controles. Média de 3 experimentos independentes. Análise estatística feita por ANOVA e pós Teste T. Sendo $n=3$.

A comparação dos resultados obtidos em relação ao controle de leveduras é mostrada na Figura 17, reforçando que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos incubados com BIO 12DH [Figura 17 A] e BIO 30DH [Figura 17 B], nas várias concentrações testadas.

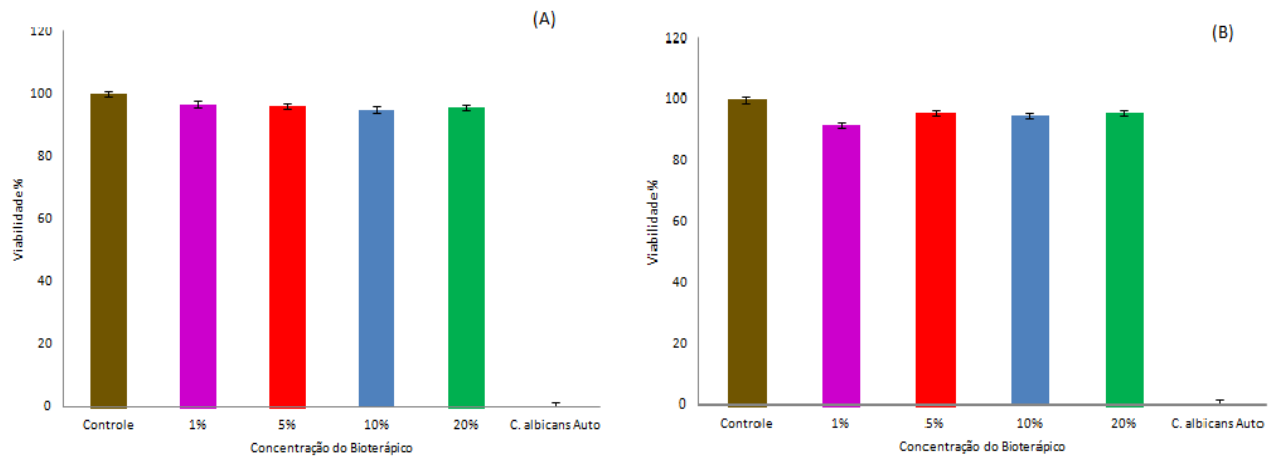


Figura 17: Suspensão de leveduras de *C. albicans* incubadas por 48 horas, a 37°C com diferentes concentrações de BIO 12DH (A) e BIO 30DH (B). Análise estatística por ANOVA e pós Teste T (n = 3).

4.5.1.3. Viabilidade de *C. albicans* após Incubação com Doses Fracionadas dos Bioterápicos

Os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH na concentração de 10% (V/V) foram adicionados de maneira fracionada às suspensões de *C. albicans* nos tempos: 0, 24 e 48 horas. As alíquotas foram distribuídas de acordo com o tempo de tratamento, com volumes diferentes, em intervalos de, pelo menos, uma hora, sendo os resultados representados como a média de quatro experimentos independentes. A Tabela 4 apresenta o número de alíquotas e respectivos volumes para cada tratamento, sendo os resultados obtidos expressos nas Figuras 18 e 19. Os resultados indicaram que a viabilidade de *C. albicans* não é afetada após 24 e 48 horas de incubação com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH. Já para os tratamentos no tempo de 0 hora observamos uma tendência de redução na viabilidade celular em todos os grupos, inclusive o tratado com água destilada 30DH. Podemos atribuir este efeito ao volume de solvente (água) adicionado à solução celular no tempo zero, o qual foi adicionado de uma única vez e também de maneira fracionada, perfazendo um total de 1 ml [Tabela 4].

Tabela 4: Número de Doses e Tempo de Tratamento das Leveduras com os Bioterápicos (n = 4).

	1º Dia (0 h)	2º Dia (24 h)	3º Dia (48 h)
Nº alíquotas X volume	1 X 1ml e 3 X 333µl	6 X 170µl	9 X 112 µl
Volume ao final do tratamento	1 ml	1020 µl	1008 µl

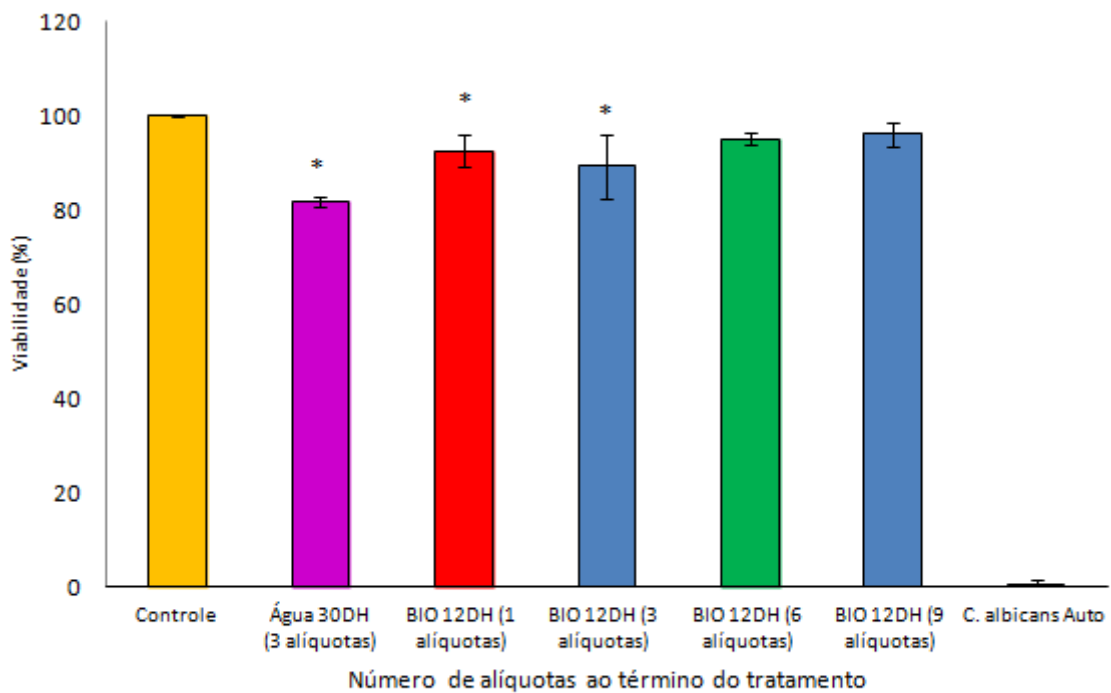


Figura 18: Avaliação da viabilidade de leveduras de *C. albicans* tratadas com o bioterápico BIO 12DH, e respectivos controles, na concentração de 10%, em doses fracionadas. Média de 4 experimentos independentes. *p < 0,05. Análise estatística por ANOVA.

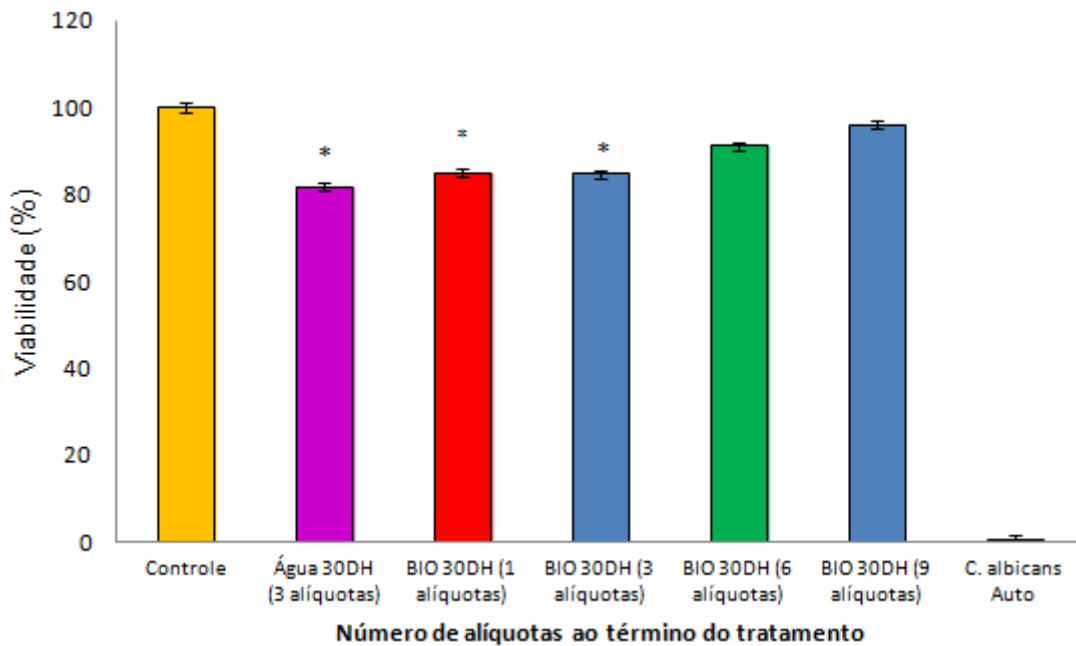


Figura 19: Avaliação da viabilidade de leveduras de *C. albicans* tratadas com o bioterápico BIO 30DH, e respectivos controles, na concentração de 10%, em doses fracionadas. Média de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Análise estatística por ANOVA.

4.5.2. Citotoxicidade dos Bioterápicos Frente às Células Epiteliais MA104

A citotoxicidade dos bioterápicos em células MA104 pós tratadas foi avaliada nas concentrações de 1, 10, e 20% (V/V) pelo método do MTT, após três experimentos feitos em quintuplicata. Os resultados encontrados indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na viabilidade celular induzida pelos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, em relação ao grupo controle (células sem tratamento). Apenas o grupo de células tratadas com água destilada 30DH na concentração de 1% apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle, sendo esta menor do que 10% [Figuras 20 e 21]. Estes resultados indicam que os bioterápicos não têm efeito citotóxico sobre as células MA104.

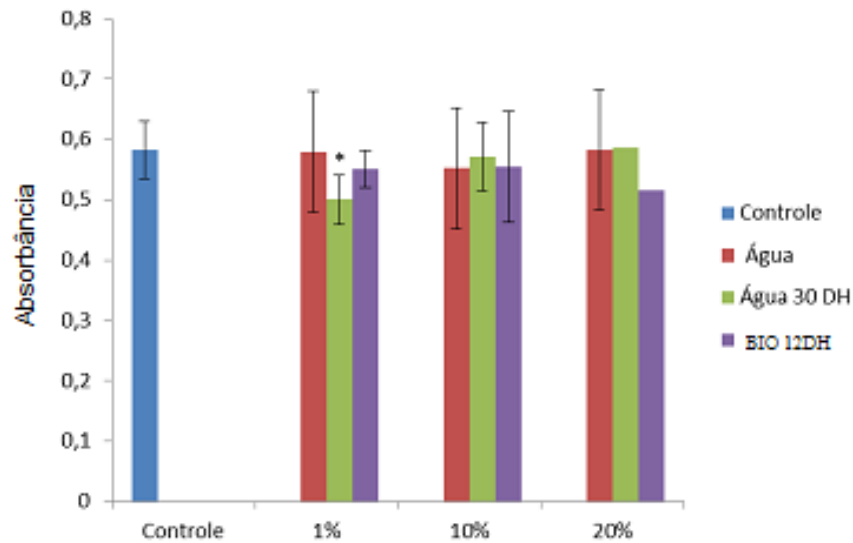


Figura 20: Viabilidade de MA104 tratada com o BIO 12DH por MTT. Média de quatro experimentos independentes, feitos em quintuplicata, submetida à análise estatística por One-way (ANOVA).

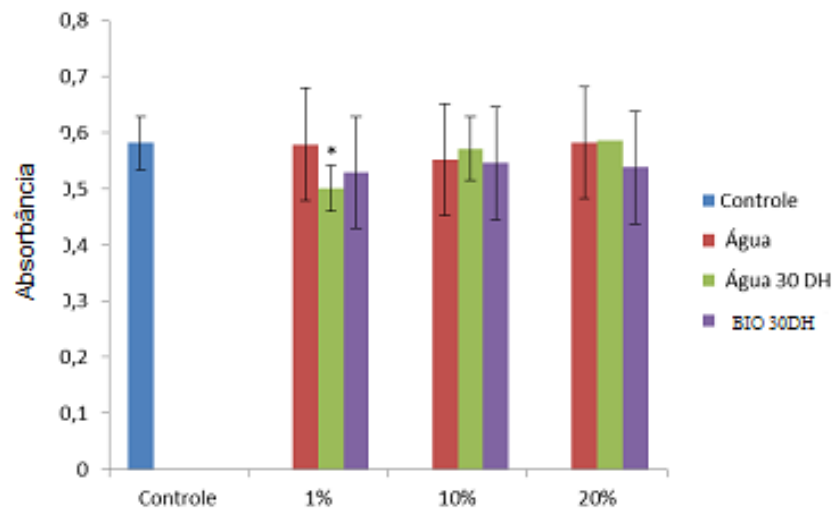


Figura 21: Viabilidade de MA104 tratada com o BIO 30DH por MTT. Média de quatro experimentos independentes, feitos em quintuplicata, submetida à análise estatística por One-way (ANOVA).

4.6. Índice de Adesão de *Candida albicans* às Células MA104

Células MA104 foram tratadas por 1, 18 e 40 dias com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, na concentração de 10%. Foram avaliados os bioterápicos preparados a partir de leveduras das cepas: ATCC® 10231™ e C11 (BIO 12DH e BIO 30DH). Adicionalmente, da cepa 11, também foi preparado um bioterápico com

hifas, após a indução com SFB, conforme descrito no item 3.10. A suspensão de MA104 (5×10^5 células/ml) foi plaqueada em placas de cultura de 6 poços com volume de 3 ml/poço e incubadas por 24 horas, à 37°C. Após incubação, as células foram lavadas e a cada poço foi adicionado 1ml de suspensão fúngica contendo 5×10^6 leveduras de *C. albicans*/ml, previamente marcadas com FITC (5mg/ml), para avaliação do índice de adesão. Os resultados indicaram diminuição em torno de 17% e 18%, no pré-tratamento com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH por 18 dias ($n = 3$), respectivamente [Figura 22], além da queda nos valores das médias de fluorescência obtidos [Tabela 5]. Para o mesmo tempo de tratamento (18 dias) também foi avaliado o índice de adesão das leveduras (cepa 11) tratadas com os bioterápicos preparados com as hifas de *C. albicans* (cepa 11; 12 e 30DH) às células MA104. O mesmo foi feito com os bioterápicos preparados com as leveduras da cepa ATCC[®] 10231 (12 e 30DH). Entretanto, no tempo de pré-tratamento com BIO 12DH e BIO 30DH por 1 ($n = 3$) e 40 dias ($n = 1$) não foi modificado de maneira estatisticamente significativa o índice de adesão das leveduras às células MA104 [Figuras 23 e 24]. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre estas situações experimentais. Em todos os tempos de tratamento (1, 18 e 40 dias) com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH foi observada uma tendência à redução na intensidade de fluorescência, assim como para os tratamentos com os bioterápicos de hifas da cepa 11 e de leveduras de ATCC[®] 10231. A inserção de novos bioterápicos neste ensaio teve como objetivo quantificar os índices de adesão de *C. albicans* tratada com bioterápicos feitos a partir da forma filamentosa (hifa), que é a mais invasiva do fungo, assim como dos efeitos decorrentes de cepas de origem diferente (ATCC[®] 10231).

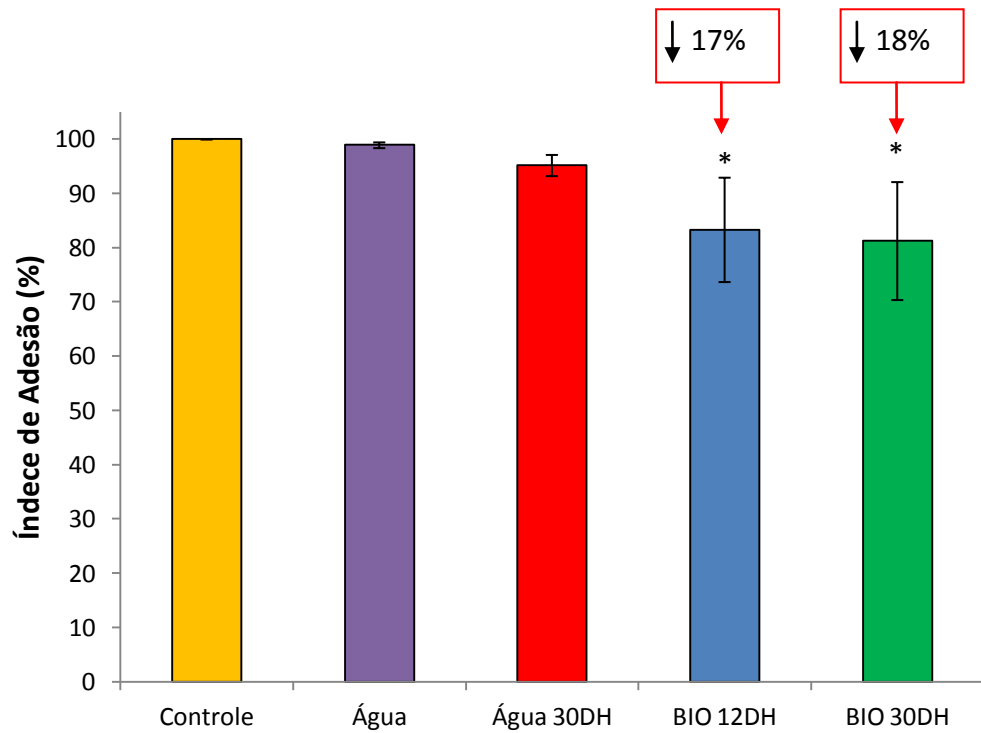


Figura 22: Índice de adesão de leveduras de *C. albicans* às células epiteliais MA104 tratadas por 18 dias com BIO 12DH e BIO 30DH. Detectada diminuição estatisticamente significativa ($*p < 0,05$) em torno de 20% no índice de adesão em relação ao controle. Análise estatística por ANOVA ($n = 3$).

Tabela 5: Média de Fluorescência Determinada por Citometria de Fluxo para os Índices de adesão de *C. albicans* às células MA104 ($n = 3$).

Média de Fluorescência	
Controle	663,06
Água	416,88
Água 30DH	472,51
BIO 12DH	326,40
BIO 30DH	357,87

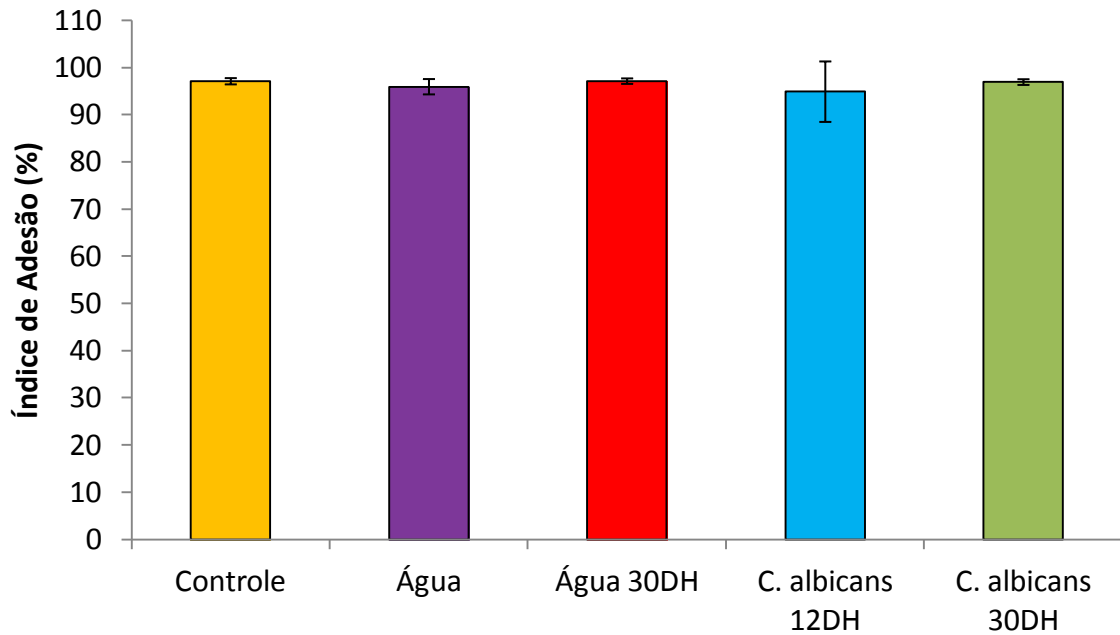


Figura 23: Índice de adesão de leveduras de *C. albicans* a células epiteliais MA104 tratadas por 1 dia com BIO 12DH e BIO 30DH. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais avaliados (n = 3).

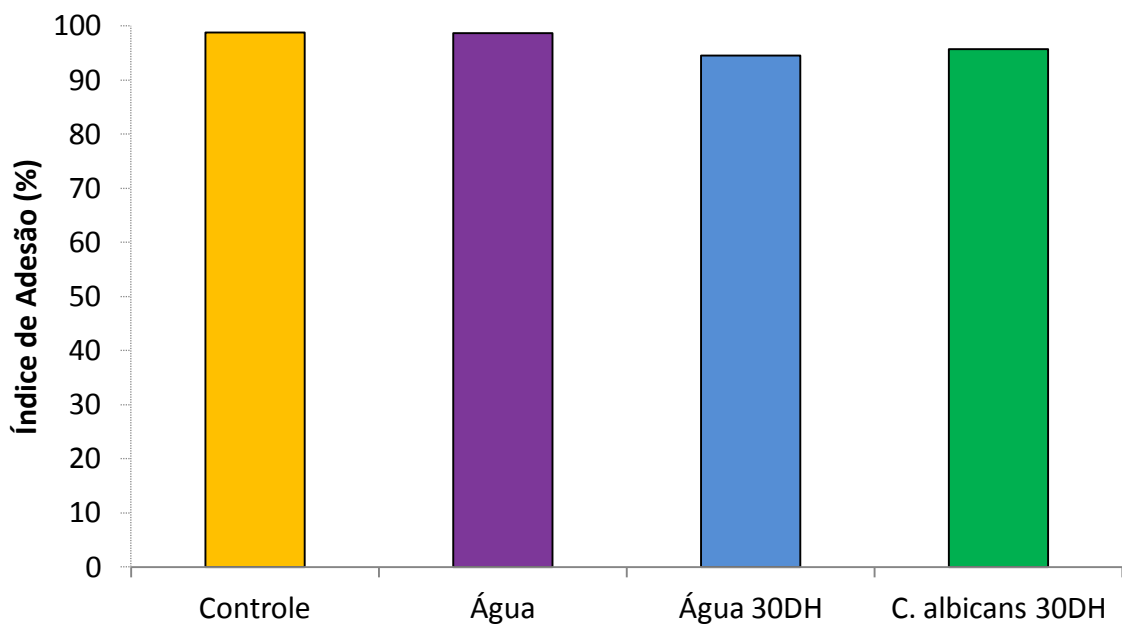


Figura 24: Índice de adesão de leveduras de *C. albicans* a células epiteliais MA104 tratadas por 40 dias com BIO 30DH. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais avaliados (n = 1).

4.7. Efeito do Bioterápico na Respiração Celular da MA104

O consumo de oxigênio pelas células MA104 pré-tratadas com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, água 30DH e água destilada, foi avaliado, em tempo real, através de oxigrafia de alta resolução. Inicialmente foi medida a respiração de rotina (R) da célula, após a adição de oligomicina (inibidor da síntese de ATP). Além disso, a taxa de consumo de oxigênio dissociada da síntese de ATP (L), assim como a capacidade respiratória máxima da célula (*Electron Transporte System/ ETS*) (E) foram determinadas após titulação com o ionóforo FCCP (0,2 - 1 μ M). O FCCP é capaz de alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, levando a um vazamento de prótons para o espaço intramembranar, atuando então como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Por fim, a respiração não mitocondrial foi determinada pela adição de KCN (1 nM), um inibidor da citocromo C oxidase (COX) e, por consequência, do Complexo IV mitocondrial. O consumo residual de oxigênio resultante será o consumo não mitocondrial, ou seja, aquele oriundo de outras vias. Para tanto, as células MA104 (5 x 10⁴ células/ml) foram cultivadas em meio de cultura suplementado (DMEM + SFB) e estimuladas com 3 a 4 alíquotas, adicionadas de 2 a 4 dias, no mínimo 6 [Figura 25] e no máximo 18 vezes [Figura 26], respectivamente. Os gráficos foram traçados considerando a capacidade máxima respiratória da célula igual a 1 (PESTA & GNAIGER, 2012).

A Figura 25 indica que a linhagem MA104 apresenta respiração de rotina (R) em torno de 70% da capacidade máxima respiratória. Este resultado foi observado tanto no grupo controle quanto no grupo de células pré tratadas por 2 dias com 6 alíquotas de BIO 30DH. Adicionalmente, as células MA104 tratadas com BIO 30DH tiveram a capacidade máxima respiratória destinada à síntese de ATP, reduzida em cerca de 5%.

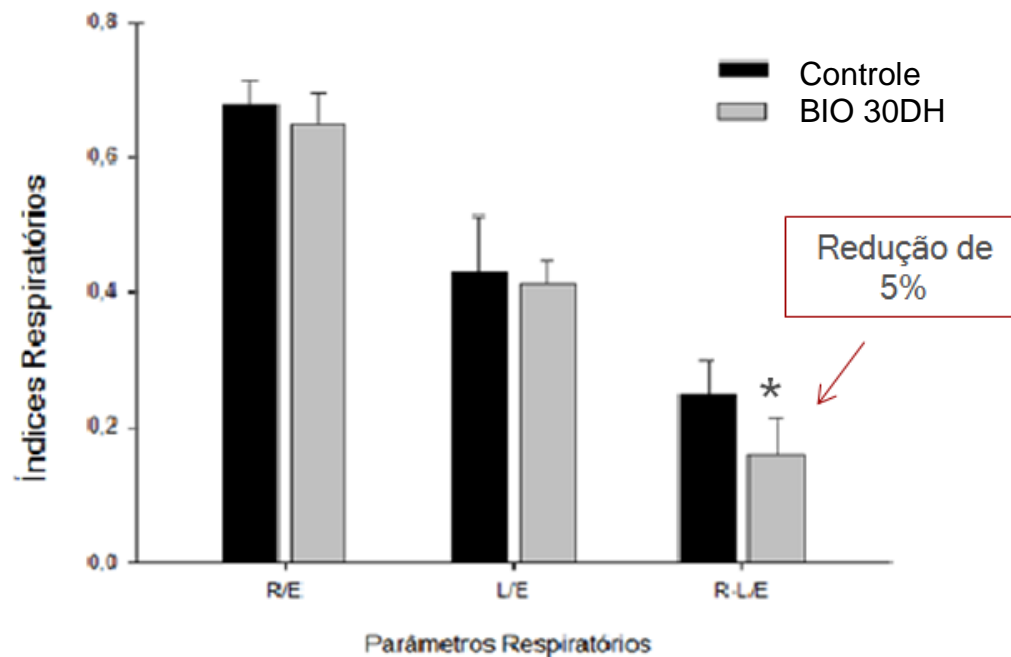


Figura 25: Determinação dos índices respiratórios de MA104 tratada com 6 alíquotas de BIO 30DH distribuídas em 2 dias ($n = 1$). (R): Respiração de rotina; (L): Respiração na presença de oligomicina (E): Capacidade respiratória máxima da célula; (R – L): Taxa de consumo associada à síntese de ATP, calculada pela diferença entre a respiração de rotina e a respiração na presença de oligomicina.

A Figura 26 representa os resultados obtidos da respiração de MA104 pré-tratadas com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, por 4 dias, com 18 alíquotas e respectivos controles. O gráfico apresenta o índice de respiração de rotina (R) para o grupo controle e o tratado com BIO 30DH em torno de 50% da capacidade máxima respiratória da célula. As células pré tratadas com BIO 12DH e água 30DH tem a respiração de rotina diminuída em cerca de 15 e 20%, respectivamente. As células que receberam tratamento com BIO 12DH e água 30DH apresentaram capacidade máxima destinada a síntese de ATP reduzida, em cerca de, 15%.

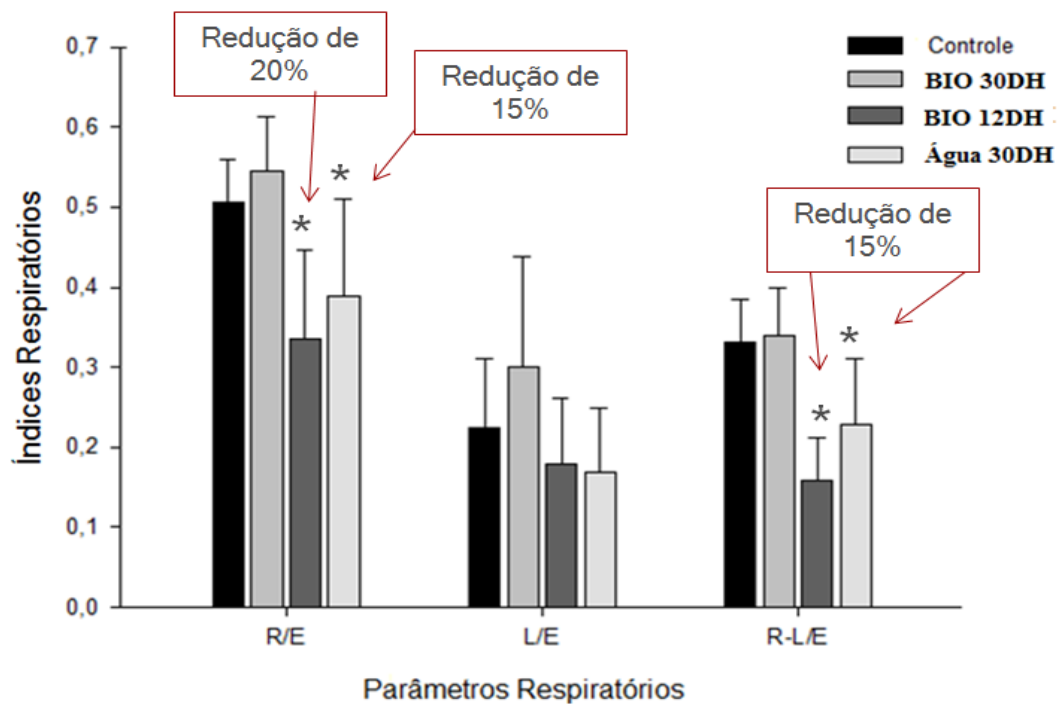


Figura 26: Determinação dos índices respiratórios de células MA104 tratadas com 18 alíquotas de BIO 12DH, BIO 30DH e água 30DH, distribuídas em quatro dias, com intervalo de pelo menos uma hora e meia entre cada alíquota ($n = 3$). (R): Respiração de rotina; (L): Respiração na presença de oligomicina (E): Capacidade respiratória máxima da célula; (R – L): Taxa de consumo associada à síntese de ATP, calculada pela diferença entre a respiração de rotina e a respiração na presença de oligomicina.

4.8. Efeito dos Bioterápicos sobre Macrófagos RAW 264-7

4.8.1. Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados representados na Figura 27 são resultantes da média de seis experimentos ($n = 6$) independentes realizados em quintuplicata pelo método de MTT. Neste ensaio apenas o BIO 30DH foi avaliado uma vez que a potência 12DH em termos quantitativos, ainda é capaz de apresentar vestígios das leveduras os quais poderiam ativar os macrófagos mantidos em cultura. Em função disso, o efeito da potência 30DH foi comparado aquele induzido pela água dinamizada (30DH) e pela água destilada. Os valores obtidos, após incubação 48 horas com estas amostras, foram comparados aqueles obtidos pelas células controle, ou seja, mantidas em meio DEMEM. Os resultados indicaram que as amostras testadas não induziram efeito citotóxico sobre os macrófagos RAW 264-7, como visto na Figura 27.

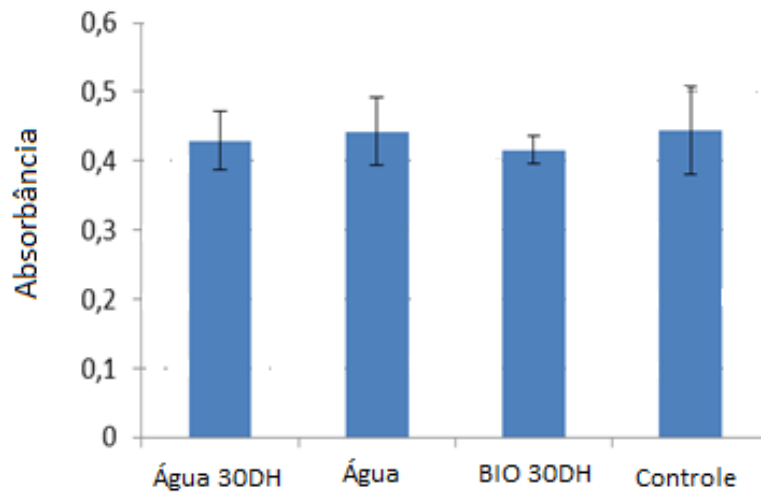


Figura 27: Avaliação da atividade mitocondrial de macrófagos RAW 264-7 tratados por 48 horas com as soluções experimentais. Não foi observado efeito citotóxico das soluções nas células testadas quando comparado ao controle. Resultados tratados estatisticamente pela análise One-way (ANOVA).

4.8.2. Análise da Produção de Óxido Nítrico

Os resultados mostraram inibição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264-7 tratadas com a água destilada dinamizada (30DH), em relação ao grupo controle (células sem tratamento), bem como em relação às células tratadas com BIO 30DH e as que receberam água destilada estéril. O gráfico apresentado na Figura 28 foi traçado com a média dos valores obtidos de seis experimentos ($n = 6$) independentes realizados em quintuplicata.

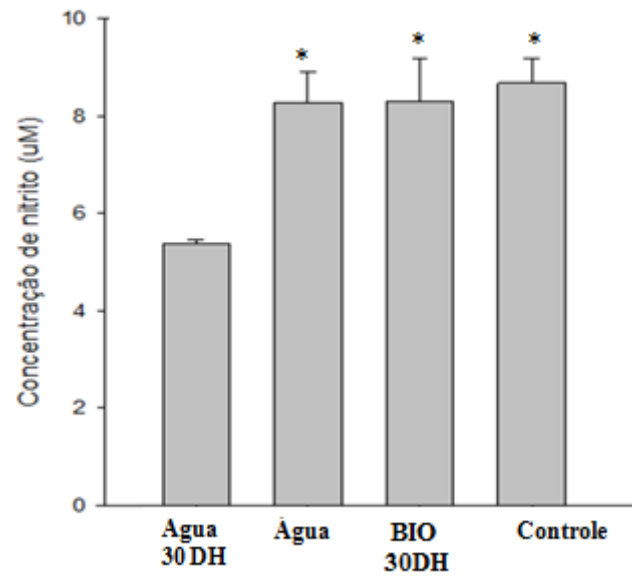


Figura 28: Determinação de Óxido Nítrico produzido por Macrófagos RAW 264-7. Média de 6 experimentos independentes ($n = 6$). * $p < 0,05$ em relação à água destilada dinamizada (30DH).

5. Discussão

A homeopatia é o sistema terapêutico criado por Hahneman, fundamentado na filosofia hipocrática da cura pelo semelhante tendo a preparação de seus medicamentos uma farmacotécnica extremamente peculiar. Suas preparações passam pelos processos de diluição e succussão, visando minimizar ou mesmo desaparecer a toxicidade da matéria prima e potencializar a ação curativa dos medicamentos (BRASIL, 2011).

A homeopatia é uma das terapias complementares mais difundidas e utilizadas no mundo. Sua aplicação no sistema de saúde vem sendo incentivada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de forma integrada às terapias clássicas. No Brasil, o apoio e incentivo a projetos de ensino, pesquisa e assistência no Sistema Único de Saúde são estimulados através das diretrizes da “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares” (BRASIL, 2006). De fato, esta política é de grande importância quanto ao reconhecimento e valorização da homeopatia no país. A Constituição Federal de 1988, especificamente o artigo 196, já traz em seu texto que a saúde é um direito de todos, garantido através de políticas que visem a redução do risco de doenças ou agravos, além de garantir o acesso igualitário a essas ações e serviços. Este conceito não difere da visão futurística de Hahnemann que, em seus escritos, já vislumbrava que uma vez reconhecido os benefícios da terapia homeopática, através de medicamentos cuidadosamente preparados, prescritos por profissionais adequadamente treinados, caberia ao Estado garantir a todos o acesso a esta terapia (HAHNEMANN, 1810 *apud* PUSTIGLIONE, 1998).

O interesse e a busca pelo conhecimento do sistema homeopático têm crescido a cada dia no Brasil e no mundo, despertando interesse de pesquisadores na elucidação, principalmente, do mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos. Grupos de estudos se organizam em encontros que buscam a troca de experiências e elucidação dos efeitos, mecanismos e comportamentos dos medicamentos homeopáticos. Ensaio pré-clínicos e clínicos com resultados surpreendentes têm sido realizados, tendo o Brasil posição de destaque, inclusive

no estudo de bioterápicos (QUEIROZ *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2008; HOLANDINO *et al.*, 2008; VARRICCHIO *et al.*, 2008; FERRAZ, *et al.*, 2011; ALEIXO, *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

A atuação da homeopatia em epidemias no Brasil aponta ser esta uma terapia também de uso profilático. O uso de medicamentos homeopáticos em epidemias de dengue em 2001 e 2007, em São José do Rio Preto (SP) e em Macaé (RJ), respectivamente, apresentou diminuição de 40% no número de casos em relação aos outros bairros da cidade. Já a cidade de Macaé obteve queda de 93%, enquanto outros municípios, com incidência anterior semelhante, apresentaram aumentos significativos (www.ecomedicina.com.br). Em 2009, um estudo triplo cego, randomizado e placebo controlado, realizado pelo grupo de Holandino e colaboradores comprovou a eficácia de medicamentos homeopáticos para a profilaxia da gripe, quando 600 crianças da Estratégia de Saúde da Família (ESF) de Petrópolis foram avaliadas (SIQUEIRA *et al.*, 2011). O estudo trouxe como resultado a diminuição de episódios de gripe nas crianças tratadas com o bioterápico de vírus influenza H₃N₂ (SIQUEIRA, 2013).

Vale destacar que além dos resultados positivos, o investimento para a produção destes medicamentos é muito menor do que os medicamentos disponíveis na terapia convencional. Adicionalmente a isso, não há relatos sobre efeitos adversos, o que indica ser a homeopatia uma terapêutica segura e economicamente viável.

No Brasil, Roberto Costa realizou estudos clínicos com bioterápicos preparados a partir do agente etiológico em sua forma viva e íntegra (COSTA, 1984, 2002). Embora seus estudos tenham sido de grande valor e contribuição para homeopatia, a maioria destes foi voltada para a clínica. Os promissores resultados clínicos despertam interesse e apontam para a necessidade de pesquisas científicas que ampliem o conhecimento atual sobre efeitos terapêuticos dos bioterápicos.

A identificação do agente infeccioso e de sua origem é de extrema importância para o desenvolvimento do bioterápico (FONTES *et al.*, 2013). Em

nosso trabalho, comprovamos a origem dos bioterápicos pesquisados, uma vez que o aparecimento de colônias de cor verde médio (Figura 5) no meio CHROMagar com posterior confirmação em Sabouraud dextrose (RUIZ *et al.*, 2003), confirmou a origem dos bioterápicos estudados, a saber, *C. albicans*. Desta forma, nossos experimentos permitiram comprovar a identidade dos microrganismos utilizados na manipulação dos bioterápicos pesquisados neste trabalho.

Siqueira em 2009 demonstrou que o vírus influenza A não sofria lise quando diluído e dinamizado em água destilada. A análise por microscopia eletrônica da potencia 1DH evidenciou presença de partículas virais íntegras o que garantiu o preconizado por Roberto Costa (SIQUEIRA *et al.*, 2013). O preparo das soluções de *C. albicans* seguiu o mesmo protocolo sendo também a água destilada estéril o solvente. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica revelaram ser possível preservar tanto a morfologia [Figuras 6 e 7] quanto a ultraestrutura [Figura 9] das leveduras.

Garcia e colaboradores (2010) obtiveram resultados em seus estudos que indicam que os parâmetros físico-químicos de solução de *Euphorbia tirucalli* na escala cinquenta milesimal se mostram diferentes entre potências da mesma escala homeopática. Em nosso trabalho verificamos da mesma forma, que os parâmetros físico-químicos de condutividade e pH dos bioterápicos BIO 12DH e 30DH, assim como da água 30DH, se apresentam diferentes quando comparados a água destilada estéril não dinamizada.

Podemos atribuir este aumento da condutividade elétrica às sucessivas diluições em múltiplos frascos e ao processo de succussão que confere às moléculas da solução uma maior energia cinética. Estes resultados estão em conformidade com estudos prévios realizados por Holandino e colaboradores, onde diferentes soluções homeopáticas foram avaliadas (HOLANDINO *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; LAROSA *et al.*, 2011). Adicionalmente os resultados indicam que a análise destes parâmetros podem ser úteis para a avaliação dos sistemas dinamizados, como previamente descrito por ELIA e colaboradores (2004 e 2007).

Soluções dinamizadas apresentam comportamento diferenciado, ainda que não sejam detectadas partículas de soluto. De fato, teoricamente acima da potência 24 DH (10^{-24}), é ultrapassado o número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$ / mol) (BASTIDE *et al.*, 1995), sendo portanto, quimicamente impossível se detectar qualquer átomo da substância original.

Em 2009, Siqueira comprovou a ausência de partículas infectivas em bioterápico de vírus Influenza H₃N₂ por espectroscopia UV-vis. A ausência de infectividade das potências 12 e 30DH dos bioterápicos de *C. albicans* foram igualmente comprovadas através da espectrofotometria no UV e, adicionalmente por leitura em citômetro de fluxo. Estes ensaios indicaram ausência de partículas fúngicas nestas soluções, sugerindo que as soluções perdem sua infectividade após sucessivas diluições, necessárias ao preparo das soluções homeopáticas.

Experimentos para verificar efeitos citotóxicos dos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH aplicados em diferentes tratamentos sobre leveduras de *C. albicans* foram realizados. Inicialmente os experimentos de quantificação de UFC indicaram queda na viabilidade celular em todas as situações experimentais. Para esclarecer estes resultados buscamos os experimentos com iodeto de propídio – substância fluorescente que se intercala entre as bases das moléculas de DNA de células com alteração da permeabilidade da membrana celular. Os resultados obtidos indicaram ausência de citotoxicidade dos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH, após 24 horas de incubação com diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20% V/V).

Desta forma, a citotoxicidade das formulações sobre células epiteliais MA104 foi avaliada. Para tanto, foi usado o ensaio colorimétrico que mede a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Esta enzima reduz o sal tetrazólio (MTT), de cor amarela, a cristais de formazan, que apresentam cor púrpura (MOSMANN, 1983; SARAVANAN, 2003). A quantidade de cristais formados é proporcional ao número de células viáveis. Nenhuma das concentrações (1, 10, e 20% V/V) testadas dos bioterápicos foi capaz de alterar a viabilidade da linhagem MA104.

Os bioterápicos de *C. albicans* não apresentaram efeitos citotóxicos sobre as células fúngicas nem sobre as células epiteliais, corroborando com o conceito da

homeopatia de que a ação dos medicamentos homeopáticos é sobre o doente e não sobre a doença, ou mesmo sobre o agente etiológico, agindo de forma segura e livre de efeitos tóxicos.

A adesão das leveduras de *Candida spp* ao epitélio é um dos fatores de virulência de extrema importância para a instalação e desenvolvimento da infecção fúngica. O ensaio de adesão foi feito com o uso de FITC e lido em citômetro de fluxo. O índice de adesão de *C. albicans*, marcada com FITC, às células MA104 não apresentou alteração após 24 horas de tratamento com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH na concentração de 10 %. Enquanto para as células tratadas com as mesmas preparações do bioterápico e mesma concentração (10 %) por 18 dias, foi possível detectar uma diminuição de 17 % para BIO 12DH e 18 % para BIO 30DH. Com base nestes resultados, o tempo de tratamento foi ampliado e a ação de novos bioterápicos foi avaliada pelo mesmo ensaio, a saber: bioterápicos de hifas de *C. albicans* cepa 11 e de levedura de *C. albicans* ATCC® 10231. Com estas novas preparações células MA104 receberam tratamento por 40 dias. Não foram encontradas diferenças significativas entre as situações experimentais, considerando os diferentes tempos de tratamento. Sendo este um único experimento, novos ensaios deverão ser feitos com o mesmo tempo de tratamento. Uma tendência comum observada nos tratamentos foi a diminuição nos índices de fluorescência, o que pode indicar redução na quantidade de leveduras aderidas às células. O índice de fluorescência é obtido pela leitura da intensidade de fluorescência de leveduras previamente marcadas com FITC medida por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos por oxigrafia de alta resolução indicaram que quando a linhagem MA104 foi tratada com 6 alíquotas do BIO 30DH sua capacidade máxima respiratória destinada à síntese de ATP, foi reduzida em cerca de 5% em relação ao controle [Figura 25]. As células que receberam tratamento com 18 alíquotas com o BIO 12DH apresentaram capacidade máxima destinada à síntese de ATP reduzida em aproximadamente 15 % quando comparada à situação controle [Figura 26].

Siqueira (2013) avaliou os efeitos do bioterápico do vírus H₃N₂ na função respiratória das células epiteliais MDCK. O protocolo de tratamento foi o mesmo usado em nossos ensaios. Células MDCK que receberam 6 e 8 tratamentos com o bioterápico íntegro 12DH e 30DH apresentaram aumento na capacidade respiratória máxima. A respiração de rotina e o consumo de oxigênio não mitocondrial não se mostraram alterados.

Resultados obtidos por El-Bacha e colaboradores (2007) com o vírus da dengue indicaram alterações na atividade mitocondrial que mimetizaram um comportamento de células infectadas por vírus. O mesmo perfil de resposta foi detectado por Siqueira quando células MDCK foram tratadas com bioterápicos H3N2.

A ação e eficácia dos medicamentos homeopáticos em células do sistema imunológico têm sido objeto de estudos e pesquisa (KUCZERA, 2013; SIQUEIRA, 2013; OLIVEIRA, 2006). Estudos clínicos, como os realizados por Aleixo e colaboradores (2012), relatam que o pré-tratamento de camundongos com bioterápico de *Typanosoma cruzi* foi capaz de estimular a produção de antígenos contra o tripanosoma.

A avaliação dos efeitos dos bioterápicos BIO 12DH e 30DH sobre os macrófagos RAW 264-7 foi realizada através do estudo de citotoxicidade (ensaio com MTT), e pela produção de óxido nítrico. Nossos resultados indicaram que os bioterápicos não exerceram efeito citotóxico sobre os macrófagos por não alterar sua viabilidade celular.

A dosagem de óxido nítrico (NO) é um estudo indicativo da produção de macrófagos que tem sido aplicada como ensaio para análise dos efeitos dos medicamentos homeopáticos, alterando esta produção (MOREIRA *et al.*, 2012; BURBANO *et al.*, 2009; CESAR *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram que possivelmente não ser essa a via de estímulo do sistema imunológico pelos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH. O fato desperta o interesse de novos estudos a fim de avaliar a ativação dos macrófagos por outras

vias, assim como liberação de citocinas induzidas pelos medicamentos homeopáticos, uma vez que, o sistema imunológico parece ser um alvo importante e envolvido com o mecanismo de ação de vários medicamentos homeopáticos.

Ainda na dosagem da produção de NO, foi observado que a água destilada 30DH foi capaz de diminuir esta produção pelos macrófagos, como em outros ensaios deste estudo, nos quais o solvente dinamizado (água destilada 30DH) foi capaz de induzir alterações metabólicas. Este fato pode ser atribuído ao chamado “efeito solvente” que tem sido relatado por outros pesquisadores que estudam o comportamento dos medicamentos homeopáticos (CAPIEAUX *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2008; AQUINO *et al.*, 2008; VARRICCHIO *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos indicam que a homeopatia, assim como o tratamento com os bioterápicos, representam terapias complementares promissoras nas infecções fúngicas, principalmente considerando a possibilidade de interferir na adesão, necessária à invasão do fungo no tecido do hospedeiro. Ao contrário dos antifúngicos disponíveis atualmente, que induzem a geração de cepas resistentes e efeitos tóxicos, os medicamentos homeopáticos proporcionam maior segurança e menor custo de tratamento.

6. Conclusões

- Foram desenvolvidos bioterápicos de leveduras de *C. albicans* (BIO 12DH e BIO 30 DH), a partir de adaptações no protocolo Roberto Costa;
- O uso de água destilada estéril e de tampão salina fosfato preservou as características morfológicas e ultraestruturais das leveduras durante a manipulação dos bioterápicos de *C. albicans*;
- O processo de dinamização não modificou as características morfológicas das leveduras de *C. albicans*;
- A capacidade infectiva dos bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH foi perdida pelas sucessivas diluições, indicando que os mesmos não possuem capacidade infectiva;
- A condutividade elétrica e o pH de BIO 12DH e BIO 30DH apresentaram aumentos em seus valores absolutos quando comparados ao controle água destilada estéril;
- A quantificação por UFC das várias diluições homeopáticas indicou ser possível detectar a presença de leveduras nas potências de 1 a 5 DH;
- BIO 12DH e 30 DH não apresentaram efeitos citotóxicos sobre o agente infeccioso (leveduras de *C. albicans*), nem tão pouco sobre as células epiteliais MA104;
- O índice de adesão de leveduras de *C. albicans* às células MA104 pré-tratadas com BIO 12DH e 30 DH, diminuiu de maneira significativa após 18 dias de tratamento;

- Os estudos de respirometria de alta resolução indicaram que a função respiratória das células MA104 foi modificada após o tratamento com BIO 12DH e 30DH;
- BIO 30 DH não apresentou efeitos citotóxicos sobre os macrófagos RAW 264-7;
- BIO 30DH não interferiu na produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264-7.

7. Perspectivas

- Ampliar os experimentos de quantificação do índice de adesão de leveduras de *C. albicans* às células epiteliais;
- Avaliar a distribuição de glicoconjugados da superfície de *C. albicans* e de Ma104 pré-tratadas com BIO 12DH e BIO 30DH;
- Avaliar os possíveis efeitos de BIO 12DH e BIO 30DH no metabolismo celular da via glicolítica;
- Ampliar os estudos dos efeitos de BIO 12DH e BIO 30DH em células do sistema imune;
- Ensaios *in vivo* com os bioterápicos BIO 12DH e BIO 30DH.

8. Referências Bibliográficas

- ABFH - Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas. Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática, 5a ed., 2007.
- ADWAN, G.; SALAMEH, Y.; ADWAN, K. Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 456-460, 2011.
- AGUADO, J.M.; RUIZ-CAMPSB, I.; MUÑOZ, P. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 29, n. 5, p. 345–361, 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. *et al.* Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, v. 48, p. 35-41, 2010.
- AKPAN, A., MORGAN, R. Oral candidiasis - Review. *Postgrad Medicine Journal*, v. 78, p. 455-459, 2002.
- ALANDAGEN, G.J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, Infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 25, p. 201-225, 2011.
- ALEIXO, D.L, FERRAZ, F.N, FERREIRA, E.C. *et al.* Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Research Notes*, v. 5, p. 352-367, 2012.
- ALVES, S.H.; MILAN, E.P.; SANT'ANA, P.L. *et al.* Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.43, p. 85-6, 2002
- ANDREU, C.M.F.; MACHIN, G.M.; ZARAGOZI, M.T.I. *et al.* Sensibilidad in vitro de cepas de *Candida* frente a fluconazol y Anfotericina B. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, v. 5, n. 2, p. 115-8, 2007.
- AQUINO, C. L.; BARBOSA G. M.; BARBOSA G. M. *et al.* High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. (AVELOZ) modify the viability and glycolitic metabolism of cell lines. *International Journal of High Dilution Research*, v. 7, p. 132-139, 2008.
- BARBOSA, G.M. Atividade Antifúngica de Correntes Elétricas Contínuas de Baixa Intensidade em Leveduras de *Candida albicans*. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- BARON, S. Medical Microbiology. 4^a ed., University of Texas Medical Branch, 1996.

BASTIDE, M.; LAGACHE, A.; LEMAIRE-MISONNE, C. Le paradigme dessignifiants: schème d'information applicable à l'immunologie et à l'Homéopathie. *Rev Int Systémique*, v. 9, p. 237–249, 1995.

BELON, P.; CUMPS, J.; ENNIS, M. Histamine dilutions modulate basophil activation. *Inflammation Research*. v. 53 , p. 181-188, 2004.

BENDEL, C.M.; HESS, D.J.; GARN, R.M. *et al.* Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Critical Care Medicine* v. 31, p. 501–507, 2003.

BONAMIN, L.V.; SATO, C.; ZALLA NETO, R. *et al.* Immunomodulation of Homeopahitic Thymulin 5CH in a BCG-induced granuloma model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2013, p. ID 686018, 2013.

BRAGA-SILVA L.; MESQUITA D.G.A.; RIBEIRO M.D. *et al.* Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 42, n. 8, p. 765-770, 2009.

_____.; MOGAMI S.S.V.; VALLE, R.S. *et al.* Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. v. 10, p. 221-224, 2010.

_____.; SANTOS, A.L.S. Aspartic Protease Inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 16, p. 2401-2419, 2011.

BRASIL, Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. Portaria 971, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Farmacopéia Brasileira. 5ª Edição, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Farmacopéia Homeopática Brasileira. 3ª Edição, 2011.

BURBANO, R.R.; LEAL, M.F.; COSTA, J.B. *et al.* Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. *Homeopathy*, v. 98, p. 45-48, 2009.

CAMPOS, V.E.B.; TEIXEIRA, C.A.A.; VEIGA, V.F. *et al.* L-Tyrosine-loaded Nanoparticles Increase the Antitumoral Activity of Direct Electric Current in a Metastatic Melanoma Cell Model. *International Journal of Nanomedicine* v. 5, p. 961-971, 2010.

CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*, v. 131 p. 493–499, 2012.

CAPIEAUX, E.; ALSALEH, G.; BORDE, C. *et al.* Evaluation of biological activities of highly diluted nucleotide sequences by using cellular models. *International Journal of High Dilution Research*, v.11, p. 194-195, 2012

CESAR, B.; ABUD, A.R.; OLIVEIRA, C.C, *et al.* Treatment with at homeopathic complex medication modulates mononuclear bone marrow cell differentiation. *Evidenced Complementary Alternative Medicine*, p. 212-459, 2011.

CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards*; 2009.

COLOMBO, A.L.; GUMIARÃES, T., Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36(5), p. 599-607, set-out, 2003.

_____.; NUCCI M.; PARK B.J. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44(8), p. 2816-2823, 2006.

_____.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.B.F. *et al.* Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 28, p. 570-6, 2007.

CORNILLOT, P. Tratado de Homeopatia; tradução Jeni Wolf. Porto Alegre, Brasil Ed. Artmed, 2005.

COSTA, B.G.B.; CIQUEIRA, C.M.; AQUINO, C.L. *et al* Development of a new biotherapeutic of *Candida albicans* to the treatment of oral candidiasis. In: 63rd Congress of the Liga Medicorum Homeopathica Internationalis (LMHI), v.63. p.1 – 8, 2008.

COSTA, L.S.; SILVA, A.P.P.; DA POIAN, A. T. *et al.* Mitochondrial Bioenergetic Alterations in Mouse Neuroblastoma Cells Infected with Sindbis Virus: Implications to Viral Replication and Neuronal Death. *PLoS ONE*. v. 7 – I. 4 – e33871 – Abril 2012.

COSTA, R. A. Homeopatia Atualizada. 2º Ed. Petrópolis, Ed Vozes, 1984.

_____. Nosódios Vivos. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Farmácia Homeopática Átomo Ltda., 2002.

COTTER, G.; KAVANAGH; K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *British journal of biomedical science*. v. 57, p. 241—9, 2000.

COWEN L.E.; ANDERSON, J.B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 139-165, 2002.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. Review Article *Trends in Microbiology*, v. 11, p. 30-36, 2003

EL-BACHA, T.; MIDDLEJ, V.; PERERIRA-DA-SILVA, A.P. *et al.* Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1772, p.1158–1166, 2007.

ELIA, V.; NAPOLI, E; GERMANO, R. The ‘Memory of Water’: an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. *Homeopathy*, v. 96, p. 163–169, 2007.

FERRAZ, F.N.; SIMONI, G.K.; NASCIMENTO, A. *et al.*, Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. *Homeopathy*, v. 100, p. 237-243, 2011.

FONTES, O.L.; CESAR, A.T.; CHAUD, M.V. *et al.* Farmácia Homeopática, Teoria e Prática. 4a ed. Ed: Manole. 2013.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde, MS. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Aspectos Clínicos, Vigilância Epidemiológica e Medida de Controle, 2000.

GALLE L., GIANINNI M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n. 4, p. 229 – 36, 2004

GARCIA, S.; HARDUIM, R.C.; HOMSANI, F. *et al.*, Physical chemical and citotoxic evaluation of highly diluted solutions of *Euphorbia tirucalli* L. prepared through the fifty millesimal homeopathic method. *International Journal of High Dilution Research*. v. 9, n. 31, p. 63 – 73, 2010.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnostico laboratorial da candidemia, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 225-234, junho 2010.

GIRALDO, P.; WITKIN S. Vaginal candidiasis: an incompreehensible challenge. *I Bras Dis Sex Transm*. v. 10, n. 5, p. 31-6, 1998.

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*, v. 128 (3), p. 277-297, 2011.

GROLL, A.H.; MCNEIL, G.L. Current challenges in the diagnosis and management of invasive infections: report from the 15th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host: Thessaloniki, Greece, p. 22–25, June 2008.

_____.; GRIST, L.M.N. Current challenges in the diagnosis and management of invasive fungal infections: report from the 15th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host: Thessaloniki, Greece, 22–25 June 2008. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, p. 101–104, 2009.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A.M. *et al.* Devolopments in fungal taxonomy, *Clinical Microbiology Reviews* v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.

GUIMARÃES, F.S.F., ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T. *et al.* In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcareo carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. *BMC Cancer*, v. 10, p.113, 2010.

HAHNEMANN, S. *Organon of Medicine* 6th ed. (translated by William Boericke), New Delhi,: B. Jain Publishers (P) Ltd; reprint edition: 2007.

HARRISON, T.S.; BROUWER, A.E. Systemic fungal infections. *Original Research Article Medicine*, v. 33, l. 5, p. 116-119, 2005.

HOANG, A. Caspofungin acetate: an antifungal agent. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, v. 58, (13), p. 1206-1214, 2001.

HOLANDA, A., FERNANDES A., BEZERRA C. *et al.*. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura. *Femina*, v. 33, n. 5, p. 347 – 51, 2005.

HOLANDINO, C., VEIGA, V.F.; RODRIGUES, M.L. *et.al.* Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. *Bioelectromagnetics*, 22, p. 470-478, 2001.

_____.; LEAL, F.D.; BARCELOS, B. *et al.* Mechanical versus handmade succussions: a physical chemistry comparison. In: GIRI's book (Signal and Images II). Germany: Ed.Heidelberg, v.2, p. 37-48, 2008.

ISHIDA, K.; RODRIGUES, J.C.F; RIBEIRO, M.D. *et al.* Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 74, p. 1-12, 2009.

KARAMAN, M.; AYYILDIZ, Z.A.; FIRINCI, F. *et al.* Effects of Curcumin on Lung Histopathology and Fungal Burden in a Mouse Model of Chronic Asthma and Oropharyngeal Candidiasis. *Archives of Medical Research*, v. 42, p. 79 – 87, 2011.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KOSSAK-ROMANACH, A. Homeopatia em 1000 conceitos. 3^a Ed. São Paulo. Ed: Elcid Editorial, 2003.

KUCZERA, D; Avaliação da ação antitumoral do complexo natural altamente diluído M1 em células de melanoma humano 1205LU. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, 2013.

LAROSA, C.P.; GONÇALVES, F.F.; AVELLAR, D.R. *et al* Physical-chemical and microbiological stability of biotherapy *Candida albicans* RC in different potencies. *International Journal of High Dilution Research* v. 10, n. 36, p. 155 – 157, 2011.

LAUN P.; HEEREN, G.; RINNERTHALER, M. *et al.*, Senescence and apoptosis in yeast mother cell-specific aging and in higher cells: A short review Review Article *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1783, l. 7, p. 1328-1334, 2008.

LÓPEZ-RIBOT J.L.; CASANOVA, M.; MURGUI, A. *et al.*, Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 41, l. 3, p. 187-196, 2004.

LYRIO, C. *Nosódios Bioterápicos: Repertório*. Rio de Janeiro: C. Lyrio, 2002.

_____.; SIQUEIRA, C.M., VEIGA, V.F. The use of homeopathy to prevent symptoms of human flu and acute respiratory infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial with 600 children from Brazilian Public Health Service. *International Journal of High Dilution Research*. v.10, n. 36, p. 174-176, 2011.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS R.; NAVARRO-GARCÍA, F. *et al.* *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 95-106, 1998.

MORA-DUARTE J.; BETTS R.; ROTSTEIN C. *et al.* Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med*, v. 347, p. 2020–9, 2002.

MOREIRA, C.O.C.; COSTA, J.F.F.B.; LEAL, M.F. *et al.*, Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. *Homeopathy*, v.101, n. 1, p. 74-79, 2012.

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

MS – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS-DST. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2007. Disponível em <http://www.aids.gov.br/data/Pages/>.

NAGLIK, J.R., CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection* 13 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS, p. 963 – 976, 2011.

OHTA A, NISHIYAMA Y, Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* 11(1):1–12, 2011.

OLIVEIRA C.C.; OLIVEIRA S.M.; GODOY L.M.; Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. *Journal of Infection*, v. 52, p. 420-32, 2006.

_____.; OLIVEIRA S.M.; GOES V.M; *et al.* Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. *Journal of Cellular Biochemistry*, p. 104:1364-77, 2008.

OLIVEIRA, I.; HARDUIM, R.C.; ZACHARIAS, C.R., *et al.* Evaluation of electrical conductivity, pH and refractive index as physico-chemical parameters for quality

control of Aveloz homeopathic solutions. *International Journal of High Dilution Research*, v.10, n. 36, p. 108 – 109, 2011.

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

OMS – Organización Mundial de la Salud Organización Ginebra. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005, 2002.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.G, Invasive candidiasis in the intensive care unit, *Critical Care Medicine*, v. 34, n. 3, p. 857-863, 2006.

PESTA, D.; GNAIGER, E, High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. Mitochondrial Bioenergetics, *Methods in Molecular Biology*, v. 810, p. 25-58, 2012.

PILTAN, D. RIST L.; SIMÕES-WÜST, A.P. *et al.* Test of a homeopathic dilution of Aconitum napellus. A clinical, randomized, double-blind, controlled crossover study in healthy volunteer. *Forsch Komplementmed*, v. 16, n. 3, p. 168-73, doi: 10.1159/000219316, 2009.

PORTELA, M.B.; KNEIPP L.F.; RIBEIRO DE SOUZA I.P. *et al.* Ectophosphatase in *Candida albicans* influences adhesion: study between HIV positive and HIV negative isolates. *Oral Diseases*, v. 16, p. 431-437, 2010.

PRADO, M.; SILVA, M.B.; LAURENTI, R. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 513-521, 2009.

PRATES, R.A. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica, *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 4, n. 1, p. 53-7, 2010.

PUSTIGLIONE, M. Homeopatia & Cuidados Básicos da Saúde. São Paulo. Editora Dynamis, 1998.

_____. O Moderno Organon da Arte de Curar de Samuel Hahemann. 1ª ed. São Paulo: Typus Editora, 2001.

QUEIROZ, A.O. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30DH: Um estudo in vivo. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Farmácia, Universidade Estácio de Sá, 2005.

REY, L. Can low-temperature thermoluminescence cast light on the nature of ultra-high dilutions? *Homeopathy* v. 96, p.170–174, 2007.

RUIZ, A. J.; GARCÍA-MARTOS, P.; PUERTO, J. L. *et al.* Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de leveduras. *Rev. Diag. Biol.*, v. 52, n. 1, p. 1-3, 2003.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso Sistémico, *Enfermidades Infecciosas y Microbiología Clínica*. v. 27, n. 6, p. 353–362, 2009.

SANTOS, A.L.S.; CARVALHO, I.M.; SILVA, B.A. *et al.* Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 46, n.2, p. 209-220, 2006.

SARAVANAN, B.C.; SREEKUMAR, C.; BANSAL, C. *et al.* A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology*, v. 113, p. 211-216, 2003.

SCHEID, L. A.; MARIO D.A.; HEINS-VACCARI, E.M. *et al.* Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* with the use of killer toxins. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* v. 52, n. 3, São Paulo, 2010.

SHENG-YUAN, R.; PO-REN, H. Invasive Candidiasis: An Overview from Taiwan, *Elsevier & Formosan Medical Association*, v. 108, n. 6, 2009.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; DUARTE, A. *et al.* Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, v. 19, p. 42– 47, 2011.

SIQUEIRA, C.M. Alterações celulares induzidas por um novo bioterápico do tipo nosódio vivo nas linhagens MDCK e J774G8. Dissertação do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

_____. Avaliação de medicamentos homeopáticos para a gripe humana por ensaios in vitro, pré-clínico e clínico. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

_____.; COSTA, B., AMORIM, A.M. *et al.* H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines, *Homeopathy*, v. 102, I.1, p. 31-40, 2013.

SOARES, A.A.D. *Farmácia Homeopática*. Ed. Organização Andrei, 1997.

SOBEL, J.D. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 14, p. 148–53, 1992.

_____.; FARO S.; FORCE, R.W. *et al.* Vulvovaginal candidíases: Epidemiologic, diagnostic an therapeutic. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 178, I. 2, p. 203-211, 1998

_____. *et al.* *Candida urinary tract infections-epidemiology. Clinical Infectious Diseases*. v.52 s. 6, p. 433-6, 2011.

TEIXEIRA, C.A.A. Mecanismos de Ação Antitumoral de Correntes Elétricas Contínuas: Um Estudo in vitro em adenocarcinoma pulmonar. Tese de Doutorado

em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

TEIXEIRA, M.Z. A Natureza Material do Homem: Estudo Comparativo do Vitalismo Homeopático com as Principais Concepções. Ed. Editorial Petrus, 2000.

_____. Homeopatia: prática médica coadjuvante. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 53, n. 4, 2007.

TETÁU, M. Samuel Hahnemann: Muito Além da Genialidade. Ed. Organon, 2001.

TRAMMELL, R.A. *et al.* Evaluation of an extract of North American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) in *Candida albicans*-infected complement-deficient mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 414–421, 2012.

TRÖSKEN ER.; FISCHER, K.; VÖIKEL, W. *et al.* Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC–MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology*, v. 219, p. 33-40, 2006.

TUMBARELLO M.; POSTERARO, B.; TRECARICHI, E.M. *et al.* Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45(6), p. 1843-1850, 2007

VARRICCHIO, M.C.B.N.; PEREIRA, C.; GOMES, T. *et al.* Chronic toxicological effects of high diluted solutions of Aveloz (*Euphorbia tirucalli L.*) on healthy mice: a preliminary study. *International Journal of High Dilution Research*, v.7, n. 25, p. 174-178, 2008.

VEIGA, V.F.; NIMRICHTER, L.; TEIXEIRA, C.A. *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 42, p. 61-74, 2005.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, v. 16, p. 97–11, 2009.

WASSENHOVEN, M.V., Painel Científico da Homeopatia, Homeopatia Baseada em Evidências, Tradução: Amarillys de Toledo Cesar. São Paulo, Editora: Agns, 2011.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 18, p. 5215-5221, 1995.

WIGHTMAN R.; BETES, S.; AMORNRATTANAPAN, P. *et al.* In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization, *The Journal of Cell Biology*, v. 164, n. 4, p. 581-591, 2004.

YAMAMOTO A.C.A.; DE PAULA C.R.; DIAS L.B.; *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá - Mato Grosso, Brasil. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 29, n. 3, p. 164-168, 2012.

YANG, Y.L., Virulence Factors of *Candida* Species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 36, p. 223 – 228, 2003.