

EFEITO DE SOLUÇÕES ULTRA-DILUÍDAS SOBRE O CRESCIMENTO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

(EFFECT OF ULTRA HIGH DILUTIONS ON THE GROWTH OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Aline de Souza Ramos¹; Débora Omena Futuro²; Sorele Batista Fiaux³

¹Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Rio de Janeiro – RJ
PG- Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói – RJ
PG- Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Rio de Janeiro – RJ
ramos.aline@gmail.com

²Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói – RJ
dfuturo@vm.uff.br

³Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niterói – RJ
sorele@vm.uff.br

Abstract. *The aim of the present study was the evaluation of the influence of ultra high dilutions on the growth of the yeast Saccharomyces cerevisiae. The ultra high dilutions tested were: magnesium sulphate 6CH, ammonium sulphate 6CH, potassium phosphate 6CH, ethanol 6CH and ethanol 13CH. However initial experiments suggested that ethanol 6CH caused a wise inhibition on the yeast growth, the effect was of stimulation of biomass formation when assay was repeated with more replicates. Therefore, no significative influence on the growth of S. cerevisiae under the conditions and ultra high dilutions tested was detected.*

Keywords. *Ultra high dilution, Homeopathy, Saccharomyces cerevisiae*

Resumo. *O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de soluções ultra-diluídas no crescimento da levedura Saccharomyces cerevisiae. As ultra-diluições testadas foram: sulfato de magnésio 6CH, sulfato de amônio 6CH, fosfato de potássio 6CH, etanol 6CH e etanol 13CH. Embora os experimentos iniciais tenham sugerido uma discreta inibição no crescimento da levedura provocada por etanol 6CH, o efeito registrado foi de estímulo à formação de biomassa quando o ensaio foi repetido com maior número de réplicas. Sendo assim, nas condições do presente estudo, não foi possível detectar influência significativa das ultra-diluições utilizadas sobre o crescimento de S. cerevisiae.*

Palavras-chave: *Ultra-diluição, Homeopatia, Saccharomyces cerevisiae*

1. Introdução

A homeopatia é uma modalidade terapêutica de ampla utilização em diferentes patologias humanas e animais. Baseia-se em observações clínicas e experimentações. Sua prática foi iniciada pelo médico alemão Samuel Hahnemann, há mais de duzentos anos (HAHNEMANN, 1842 – Tradução em português, 2001).

Os medicamentos homeopáticos consistem, em linhas gerais, de soluções ultra-diluídas, obtidas por diluições e agitações sucessivas numa técnica denominada “dinamização”. Quanto maior a dinamização, maior a diluição. Os diluentes utilizados na técnica são: água, soluções hidroalcoólicas, soluções hidroglicerizadas e lactose. O ponto de partida para a preparação de medicamentos homeopáticos é proveniente dos reinos animal, vegetal ou mineral (BRASIL, 1997).

Embora existam evidências clínicas da ação dos medicamentos homeopáticos, o fato de se apresentarem freqüentemente muito diluídos coloca em dúvida o seu efeito fisiológico. Uma metodologia que permita a caracterização das ultra-diluições e comprove alguma atividade biológica pode ser útil por aumentar a confiança de médicos e pacientes no tratamento. Além disso, a análise pode ser aplicada na padronização das técnicas de obtenção e inativação desses sistemas, bem como no controle de qualidade dos produtos, contribuindo assim para a garantia da eficácia da terapia.

Na tentativa de elucidação do fenômeno, diversas metodologias e modelos têm sido empregados às ultra-diluições, entretanto os resultados foram considerados pouco satisfatórios. Metodologias baseadas em análises físicas ou físico-químicas foram estudadas, mas a necessidade de ajuste dos equipamentos à alta sensibilidade leva à confusão entre sinais e ruídos e os resultados se tornam pouco confiáveis. Devido à complexidade de detecção e caracterização das propriedades de ultra-diluições é possível que um ser vivo seja mais adequado para demonstrar os efeitos dos sistemas dinamizados (ZACHARIAS, 2002).

Os microrganismos, por serem mais simples, são freqüentemente escolhidos como ponto de partida para as pesquisas. A utilização de culturas microbianas traz como vantagens principais a facilidade de manipulação e de verificação das respostas se comparadas com a utilização de mamíferos (MUDA e McKENNA, 2004; BAYS e MARGOLIS, 2004). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de ultra-diluições sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura não patogênica que já vem sendo utilizada como modelo para animais.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. A cultura foi conservada em meio Agar Sabouraud e armazenada a 4°C. O meio de cultivo utilizado em todos os experimentos apresentou a seguinte composição [por litro]: sacarose, 10g; (NH₄)₂SO₄, 0,5g; KH₂PO₄, 1,5g; MgSO₄ . 7H₂O, 0,5g; extrato de levedura, 5g. O pH inicial foi igual a 6,0. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer com 100mL de capacidade, preenchidos com 30mL de meio de cultivo, durante 24 h, a 32° C e sob agitação de 144 rpm em *Reciprocal Water Bath Shaker* [model R76, New Brunswick Scientific Co., Inc.]. O inóculo foi preparado por um crescimento prévio de *S. cerevisiae* por 12h, nas mesmas condições dos experimentos. Da suspensão de células assim obtida, 3mL foram utilizados para inocular cada frasco de cultivo.

2.2. Preparo das soluções ultra-diluídas

As ultra-diluições foram preparadas de acordo com o método hahnemanniano descrito na Farmacopéia Homeopática Brasileira 2ª edição (BRASIL, 1997). Os pontos de partida foram sulfato de magnésio heptaidratado [MgSO₄ . 7H₂O], sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], fosfato de potássio monobásico [KH₂PO₄] e etanol 96% [v/v]. Após diluição na proporção de 1/100 [v/v] e 100 succussões em Dinamizador Mecânico [modelo Denise, marca AUTIC], essas soluções foram denominadas de dinamização 1CH. As dinamizações seguintes foram

obtidas por diluições sucessivas na mesma proporção e seguidas de 100 sucussões em Dinamizador Mecânico. Água ultra-pura, obtida pelo sistema Milli-Q, foi empregada como diluente. As ultra-diluições foram obtidas cerca de 24h antes dos ensaios e armazenadas em geladeira.

2.3. Estudo da influência de soluções ultra-diluídas sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram adicionados 3mL de solução ultra-diluída antes da inoculação e acrescentados 100µL da mesma ultra-diluição a cada hora de crescimento. As adições ocorreram a partir de 1,5h até 9,5h, totalizando nove incrementos. Nas mesmas condições foram realizados experimentos em branco, substituindo-se a solução ultra-diluída por água ultra-pura obtida pelo sistema Milli-Q. Os cultivos foram conduzidos em triplicata ou quintuplicata, conforme descrito nos resultados, sendo um frasco por amostra.

2.4. Métodos analíticos

Uma porção homogênea de cada frasco de cultivo foi centrifugada a 3500 rpm, 30°C, durante 10 minutos [Centrifuge 5403 Eppendorf]. Após a separação do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes por ressuspensão em água destilada seguida de centrifugação. A densidade óptica foi determinada a 400nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Os valores foram convertidos para concentração celular em g/L através de curva padrão associada ao peso seco.

3. Resultados e Discussão

De acordo com a prática médica, baixas dinamizações, como 6CH, são empregadas quando se deseja um efeito físico em humanos. Dinamizações elevadas teriam efeito mental. Por esse motivo, para a observação do efeito no crescimento da levedura, inicialmente foram testadas, em triplicata, quatro substâncias na dinamização 6CH:

- *sulfato de magnésio*, um dos componentes do meio de cultivo e um possível estimulante do crescimento (WALKER e MAYNARD, 1996);
- *sulfato de amônio*, presente no meio de cultivo como fonte de nitrogênio;
- *fosfato de potássio*, presente no meio de cultivo como fonte de fósforo, importante elemento para o desenvolvimento da levedura;
- *etanol*, um produto do metabolismo de *S. cerevisiae* e que pode ser utilizado como fonte de carbono.

A biomassa foi quantificada apenas após 24 horas de crescimento. Os resultados estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Avaliação da influência de ultra-diluições na dinamização 6CH sobre o crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 9763. Valor de *p* em comparação com o ensaio em branco.

Ultra-diluição	Biomassa (g/L)	<i>p</i>
Branco	4,560 ± 0,077	-
<i>Etanol 6CH</i>	4,436 ± 0,041	0,0695
<i>Sulfato de magnésio 6CH</i>	4,477 ± 0,060	0,2148
<i>Fosfato de potássio 6CH</i>	4,517 ± 0,087	0,5564
<i>Sulfato de amônio 6CH</i>	4,564 ± 0,223	0,978

Foi possível verificar que o *etanol 6CH* apresentou discreta inibição no crescimento de *S. cerevisiae*. O valor encontrado é apenas marginalmente significativo, com valor de $p = 0,0695$. Os demais resultados não foram considerados diferentes da água.

A ultra-diluição *etanol 6CH* foi empregada inicialmente com o objetivo de experimento-controle, pois o etanol é considerado um solvente inerte na Homeopatia (BRASIL, 1997). Este resultado inesperado pode ser advindo do fato de ser este um produto do metabolismo do microrganismo em estudo, além de ser tóxico acima de certas concentrações. Assim, com a intenção de detectar um efeito mais evidente e de avaliar uma possível diferença entre as potências, um segundo experimento foi conduzido desta vez em quintuplicata, com *etanol 6CH* e *13CH*. Esta diluição (13CH) foi escolhida por ser superior ao limite de Avogadro.

A biomassa foi quantificada após 24h de cultivo. Os resultados estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Avaliação da influência de *etanol 6CH* e *etanol 13CH* sobre o crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 9763. Valor de p em comparação com o ensaio em branco.

Ultra-diluição	Biomassa (g/L)	p
Branco	5,026 ± 0,189	-
<i>Etanol 6CH</i>	5,227 ± 0,099	0,077
<i>Etanol 13CH</i>	5,057 ± 0,267	0,8508

Pela análise da **Tabela 2** é possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa na formação de biomassa com a adição de ultra-diluição *etanol 6CH*, *etanol 13CH* ou água ultra-pura. Embora *etanol 6CH* tenha exercido uma influência marginalmente significativa [$p = 0,0770$] quando comparado com a água, este resultado é contraditório com os anteriores, pois neste último experimento foi observada variação positiva na concentração final de células, ao contrário dos ensaios anteriores que registraram ligeira inibição.

4. Considerações finais

Os dados experimentais sugerem que ultra-diluições do etanol podem ter influência sobre o crescimento de *S. cerevisiae*, embora esses resultados tenham sido apenas marginalmente significativos [$0,05 < p < 0,10$]. Além disso, os efeitos encontrados foram contraditórios, já que foi observada inibição à formação de biomassa em alguns ensaios e em outros foi verificado estímulo ao crescimento. As demais ultra-diluições não exerceram qualquer ação detectável pela metodologia empregada.

O trabalho desenvolvido até aqui ainda não foi suficiente para concluir se existe influência de ultra-diluições sobre o crescimento da levedura. Experimentos com adições mais frequentes de substâncias ultra-diluídas durante o crescimento e por maiores intervalos de tempo podem trazer melhores resultados. Vale ressaltar que cada hora de vida de *S. cerevisiae* equivale a aproximadamente um ano de vida do ser humano. É justificável, então, a diminuição dos intervalos de adição das soluções de teste ao cultivo do microrganismo.

Outras substâncias ainda não testadas podem também ser utilizadas, pois podem apresentar influências mais significativas sobre o crescimento. Pelo mesmo motivo, o emprego de outros microrganismos pode ser mais adequado, acrescentando informações sobre a ação fisiológica de tais soluções.

Há ainda a hipótese de o efeito das ultra-diluições não ser na formação de biomassa, mas em outras características. Assim, podem ser investigadas, por exemplo, alterações na morfologia, na taxa de crescimento ou na formação de produto.

5. Referências

- BAYS, N.; MARGOLIS, J. Yeast as a budding technology in target validation. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 2, p. 157-162, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopéia Homeopática Brasileira. 2ª Edição. Parte I. São Paulo: Atheneu Editora, 1997.
- HAHNEMANN, S. *Organon da arte de curar*. 6ª Ed. Trad. Edméa Marturano Villela e Izaio Carneiro Soares. São Paulo: Robe Editorial, 2001. 248 p. Tradução de: *Organon der Heilkunst*. 1842.
- MUDA, M.; McKENNA, S. Model organisms and target discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 1, p. 55-59, 2004.
- WALKER, G.M.; MAYNARD, A.I. Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 455-459, 1996.
- ZACHARIAS, C.R. Physical research in dynamized systems. *Medical Hypotheses*. v. 58, n. 6, p. 523-526, 2002.

Este artigo corresponde a uma parte da monografia apresentada por A.S. Ramos ao Curso de Pós-graduação em Ciência dos Medicamentos e Alimentos da Universidade Federal Fluminense (Área de Concentração: Medicamentos), sob a orientação de S.B. Fiaux e D.O. Futuro.

Este trabalho teve o apoio da Farmácia Universitária da Universidade Federal Fluminense e da Fundação Euclides da Cunha.