

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAURA ROLLA DE LEO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DA TINTURA DE *Cocos nucifera L.* E
DINAMIZAÇÕES HOMEOPÁTICAS**

Belo Horizonte

2022

Laura Rolla De Leo

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DA TINTURA DE *Cocos nucifera* L. E DINAMIZAÇÕES
HOMEOPÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho

Belo Horizonte

2022

L576c Leo, Laura Rolla de.
Caracterização físico-química e avaliação da atividade imunomoduladora da tintura de *Cocos nucifera L.* e dinamizações homeopáticas [recurso eletrônico] / Laura Rolla de Leo. – 2021.
1 recurso eletrônico (119 f. : il.) : pdf.

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader

1. Cocos – Teses. 2. Tintura mãe – Teses. 3. Cromatografia – Teses. 4. Imunomodulação – Teses. 5. Anti-inflamatórios – Teses. 6. Antioxidantes – Teses. I. Castilho, Rachel Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA TINTURA DE
Cocos
nucifera L. E DINAMIZAÇÕES HOMEOPÁTICAS”*

LAURA ROLLA DE LÉO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Gilberto Ribeiro Vieira
Universidade Federal do Acre - UFAC

Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Antony de Paula Barbosa
Nova Faculdade (suplente)

Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (suplente)

Belo Horizonte, 12 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2021, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Duarte Vianna Soares, Subcoordenador(a)**, em 16/08/2021, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Augusto Gomes Faraco, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2021, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antony de Paula Barbosa, Usuário Externo**, em 17/08/2021, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto Ribeiro Vieira, Usuário Externo**, em 19/08/2021, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0889978** e o código CRC **890587FE**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, e todos os seres de luz que estão presentes em minha vida, que permitiram e amorosamente me conduziram para este caminho, possibilitando que eu chegasse até aqui. Agradeço também aos seres iluminados que materializaram a terapêutica homeopática e propagaram para o mundo esta nova abordagem.

Agradecimento especialmente a Professora Rachel Castilho, que foi a maior incentivadora de todos os meus esforços para chegar até aqui. Obrigada Rachel, por ter acreditado no meu potencial, pela compreensão das minhas dificuldades, pela amigável empatia, pelo carinho comigo e com todos seus alunos e por essa energia tão vigorosa e motivadora que nos contagia! O mestrado foi uma experiência difícil, com tantos compromissos, porém prazerosa, pois preencheu uma busca pessoal de aprimoramento. Foi um período de muito aprendizado e compartilhamento!

Reservo ainda um agradecimento especial à minha família, que esteve ao meu lado durante todo este percurso, me apoiou, me deu suporte, me compreendeu e incentivou a seguir nesta caminhada! Gratidão aos meus pais, por todo amor e suporte.

Quando entrei para o Gnosiah, sabia que o desafio de conciliar a vida profissional e os estudos para concluir meu projeto seria grande, mas não poderia imaginar que receberia a grande honra de fazer parte de uma família tão linda!

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, em especial a Letícia Barbosa que doce e gentilmente (e muito paciente) me deu as mãos para que eu prosseguisse! À Paula Leite, tão carinhosa, tão gentil e prestativa, foi imprescindível nas minhas correções! À Juliana Amorim por me acolher e apoiar em diversos momentos desta trajetória! Aos demais colegas de laboratório, agradeço pela parceria e amizade. Olavo Carvalho e André Hilário, agradeço a vocês por toda a solicitude em me atender quando precisei, principalmente pela amizade e companhia.

Agradeço ainda aos Professores André Faraco, Cristina Vianna e Marina Scopel por também me orientar em alguns momentos e permitir que utilizasse os laboratórios para a continuidade da pesquisa. Agradeço também a Professora Paula Melo de Abreu Vieira por toda ajuda e parceria na conclusão dos ensaios.

Ao Pedro H. Correa, que compartilhou comigo horas a fio de bancada, nos finais de semana!

“A única forma de chegar ao impossível, é acreditar que é possível.” Lewis Carrol

“A verdade é eterna, como a própria divindade. Ainda que os homens possam negligenciá-la por muito tempo, chegará por fim o dia em que, cumprindo os altos desígnios da Providência, seus raios penetrem a nuvem das preocupações, e derramem sobre a espécie humana uma claridade benéfica, que nada será capaz de extinguir.” Hahnemann (Organon da Arte de Curar, Notas da introdução)

RESUMO

Cocos nucifera L., conhecido simplesmente como coco, é uma importante árvore frutífera, bem distribuída no mundo, especialmente nos países tropicais, onde já é usada há milhares de anos na medicina tradicional como antiblenorrágico, febrífugo, para bronquite e gengivite. No Brasil é utilizada como imunomodulador para gripes e resfriados. Estudos recentes apontam que extratos da fibra da casca possuem várias atividades biológicas, dentre elas, antinoceptiva, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiviral. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar as características físico-químicas da Tintura Mãe (TM) de *C. nucifera* e derivadas homeopáticas, além da sua atividade como imunomoduladora e antioxidante. A TM e suas derivadas homeopáticas foram produzidas conforme métodos descritos na Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª ed. (2011). A análise colorimétrica realizada na TM demonstrou que sua cor é castanho avermelhada e as derivadas D1 e C1 são amarelo claro, as demais são transparentes. A TM apresenta pH de 5,5, sendo ácido devido sua constituição rica em fenólicos. A densidade relativa encontrada para TM foi de 0,9185 g/mL e o teor de resíduo seco do extrato vegetal é 1,95%. Na quantificação de taninos totais por espectrofotometria com reagente de fosfomolibdotungstico a TM demonstrou um teor de 2,28%. A análise por espectroscopia no ultravioleta (UV) da TM e das derivadas C1 e D1 de *C. nucifera* evidenciou absorção $\lambda_{\text{máx.}}$ de aproximadamente de 210 e 300 nm, sendo esta absorção característica da presença de fenólicos. A análise por espectroscopia no infravermelho (IV) da TM confirmou a constituição rica em fenólicos, mas não se mostrou eficiente para análise das derivadas trituradas C1-C3. A composição química da TM de *C. nucifera*, foi avaliada por CCD, CLAE-DAD e UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS, sendo possível a identificação de substâncias fenólicas: ácido hidroxibenzóico, ácido clorogênico, catequina/epicatequina, 3 isômeros do ácido cafeoilchiquímico, 2 derivados do ácido cafeoilchiquímico e os flavonoides xanthorhamnina e cianidina-*O*-hexosídeo/miricetina-*O*-pentosídeo. A TM demonstrou atividade antioxidante moderada, $91,90 \pm 15,60 \mu\text{g/ml}$, em modelo de DPPH. As derivadas também apresentaram atividade antioxidante, mesmo em potências ultradiluídas, C5 e D4 não apresentaram diferenças estatísticas significativas de C30 e D30, diluições de 10^{60} e 10^{15} , respectivamente. Sendo assim, o processo farmacotécnico de produção das derivadas homeopáticas, mantém a atividade encontrada, mas apresenta-se não linear, com oscilação dos resultados. A TM e derivadas homeopáticas não demonstraram citotoxicidade em macrófagos e possuem atividade imunomoduladora frente ao TNF- α e interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10). Os resultados obtidos dão subsídios científicos para a utilização da TM e derivadas de *C. nucifera* e fornecem perspectivas para outros estudos, visando seu uso como imunomodulador.

Palavras chave: Coco; *Cocos nucifera*; perfil físico-químico; cromatografia; imunomodulação; anti-inflamatório; antioxidante.

ABSTRACT

Cocos nucifera L., known as coconut, is an important fruit tree, well distributed around the world, especially in tropical countries, where it has been used for thousands of years in traditional medicine as an antibleorrhagic, febrifuge, for bronchitis and gingivitis. In Brazil it is used as an immunomodulator for colds and flu. Recent studies indicate that bark fiber extracts have several biological activities, including antinoceptive, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and antiviral. The aim of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of *C. nucifera* Mother Tincture (TM) and homeopathic derivatives, in addition to its activity as an immunomodulator and antioxidant. TM and its homeopathic derivatives were produced according to methods described in the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia, 3rd (2011). The colorimetric analysis performed on the TM showed that its color is reddish brown and derivatives D1 and C1 are light yellow, the others are transparent. TM has a pH of 5.5, being acidic due to its rich constitution in phenolics. The relative density found for TM was 0.9185 g/mL and the dry residue content of the plant extract is 1.95%. In the quantification of total tannins by spectrophotometry in phosphomolybdotungstic reagent, TM showed a content of 2.28%. Ultraviolet spectroscopy (UV) analysis of TM and C1 and D1 homeopathic derivatives of *C. nucifera* showed absorption λ_{max} of approximately 210 and 300 nm, this absorption being characteristic of the presence of phenolics. The analysis by infrared spectroscopy (IR) of the TM confirmed the constitution rich in phenolics, but it was not efficient for the analysis of the C1-C3 trituration derivatives. The chemical composition of *C. nucifera* TM was evaluated by CCD, HPLC-DAD and UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS, making it possible to identify phenolic substances: hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, catechin/epicatechin, 3 isomers of caffeoylshikimic acid, 2 derivatives of caffeoylshikimic acid and the flavonoids xanthorhamnin and cyanidin-O-hexoside/myricetin-O-pentoside. TM demonstrated moderate antioxidant activity, $91.90 \pm 15.60 \mu\text{g/ml}$, in a DPPH model. The homeopathic derivatives also showed antioxidant activity, even at ultra-diluted potencies, C5 and D4 did not show statistically significant differences from C30 and D30, dilutions of 10^{60} and 10^{15} , respectively. Thus, the pharmacotechnical process of production of derivatives maintains the activity found, but it is non-linear, with fluctuating results. TM and homeopathic derivatives did not demonstrate cytotoxicity in macrophages and show an immunomodulating activity against TNF- α and interleukins 6 and 10 (IL-6 and IL-10). The results obtained provide scientific support for the use of TM of *C. nucifera* and derivatives and provide perspectives for further studies, aiming at its use as an immunomodulator.

Keywords: Coconut; *Cocos nucifera*; physicochemical profile; chromatography; immunomodulation; anti-inflammatory; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

- 1 *Cocos nucifera* (a) fruto de *Cocos nucifera* (imagem por Franz Eugen Köhler) (b) parte aérea
- 2 Estruturas químicas de algumas substâncias já isoladas de *C. nucifera*
- 3 Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH na TM de *Cocos nucifera*
- 4 Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH das derivadas centesimais e decimais de *Cocos nucifera*
- 5 Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH das derivadas centesimais e decimais de *Cocos nucifera* com diluição seriada
- 6 Estrutura de *Cocos nucifera* L. e a extração por maceração do mesocarpo fresco
- 7 Identificação das Cores pelo método espectrofotométrico.
- 8 *Cocos nucifera*: TM e suas derivadas homeopáticas em anteparo branco.
- 9 Espectro UV (λ 200 – 400nm) da tintura de *Cocos nucifera*, e derivadas D1, CH1 e solução de etanol a 5%, como controle.
- 10 Espectros UV das derivadas homeopáticas D6 (azul), CH6 (cinza), D12 (marrom) e CH12 (roxo) de *Cocos nucifera*.
- 11 Espectros UV das derivadas homeopáticas CH6 (rosa), D6 (laranja); CH12 (azul); Verde: D12 (verde) de *Cocos nucifera* e água (vermelho).
- 12 Espectro UV (λ 200 – 400nm) da TM de *Cocos nucifera* (Roxo), e derivadas D1(verde), CH1 (azul) e água, como controle (vermelho).
- 13 Espectro infravermelho da tintura de *Cocos nucifera*.

- 14 Espectros de absorção na região do IV para as derivadas CH1, CH2 e CH3 de *Cocos nucifera* e dos respectivos controles em lactose.
- 15 Espectro de infravermelho da lactose monohidratada.
- 16 Cromatograma obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: anisaldeído sulfúrico.
- 17 . Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: Cloreto de alumínio 5%p/v. a) no visível; b) luz UV λ 254 nm; c) luz UV λ 365 nm.
- 18 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: Cloreto Férrico. a) no visível; b) luz UV λ 254 nm; c) luz UV λ 365 nm.
- 19 Cromatografia em Camada Delgada.
- 20 Cromatograma da TM de *Cocos nucifera* e espectros de ultravioleta de alguns picos majoritários, λ 210 nm.
- 21 Cromatogramas das substâncias de referência: a) catequina TR:12,021s, b) epicatequina TR:16,216s, c) ácido clorogênico, TR: 13,071s. λ 210 nm.
- 22 Cromatograma obtido por CLAE- DAD para a coinjeção da tintura de *Cocos nucifera* e dos padrões catequina, epicatequina e ácido clorogênico.
- 23 Cromatogramas da tintura de *C. nucifera* obtidos no UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Cromatograma de pico base (BPC – *base peak chromatogram*) B. Cromatograma observado em λ 210 nm C.
- 24 Curva de calibração (%atividade antioxidante x concentração) obtidas por regressão linear em ensaio (DPPH) (n=3) para a TM de *Cocos nucifera*.
- 25 Estruturas químicas (A) ácido cafeico; (B)Ácido ferúlico e (C) ácido p-cumárico.

- 26** Atividade Antioxidante (%) de cada matriz nas escalas Centesimal (a) e Decimal (b).
- 27** Atividade antioxidante das derivadas centesimais de *Cocos nucifera* no ensaio (DPPH) (n=3)
- 28** Atividade antioxidante das derivadas decimais de *Cocos nucifera* no ensaio (DPPH) (n=3)
- 29** Citotoxicidade das derivadas homeopáticas *Cocos nucifera* (D1, D3,D9, CH1, CH4, CH8, CH12) para macrófagos 264.7 em 24h (A), 48h (B) de tratamento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão das quadruplicatas.
- 30** Quantificação de citocinas (a)IL-6, (b) TNF e (c) IL-10 em sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 não estimulados (-) ou estimulados (+) com LPS+IFN- γ , tratados com *Cocos nucifera* 48 horas. Resultados expressos como média e desvio padrão das quadruplicatas. #p<0,05 em relação às células não estimuladas; *p<0,05 em relação às células estimuladas com LPS+IFN- γ .

LISTA DE TABELAS

- 1 Usos tradicionais descritos para *C. nucifera* de acordo com o país
- 2 Atividades Farmacológicas de extratos e frações de *Cocos nucifera* L..
- 3 Gradiente de eluição para análise por CLAE da tintura de *Cocos nucifera*.
- 4 Gradiente de eluição para análise por LC-MS da tintura de *Cocos nucifera*.
- 5 Determinação do resíduo sólido de vegetal fresco
- 6 Análise colorimétrica por espectrofotometria da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas.
- 7 Determinação de densidade relativa da TM de *Cocos nucifera*.
- 8 Determinação de pH em triplicata da dispersão a 10% em água da TM de *Cocos nucifera*
- 9 Resultado da determinação do resíduo seco da TM de *Cocos nucifera*.
- 10 Valores de fator de retenção Rf encontrados na cromatoplaça da TM de *Cocos nucifera*. Revelador Anisaldeído sulfúrico.
- 11 Valores de tempo de retenção para substâncias identificadas na TM de *Cocos nucifera* por co-injeção com padrões de referência por CLAE-DAD.
- 12 Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação da tintura de *Cocos nucifera* utilizando UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS.
- 13 Percentual de Atividade Antioxidante para as derivadas homeopáticas de *Cocos nucifera* nas escalas Centesimal e Decimal e diferença estatística entre elas.
- 14 Resultado da avaliação da citotoxicidade de TM de *Cocos nucifera* em macrófagos RAW 264.7.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CH	Derivada centesimal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DH	Derivada decimal
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por eletrospray
FHB	Farmacopeia Homeopática Brasileira
INF- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MIR	Infravermelho médio
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
NK	Natural killer
NIR	Infravermelho próximo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
Rf	Fator de Retenção
SUS	Sistema Único de Saúde
TM	Tintura/mãe
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL:	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	HOMEOPATIA	18
3.2	MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	24
3.3	SISTEMA IMUNOLÓGICO	27
3.4	COCOS NUCIFERA L.	31
4	MÉTODOS	37
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO	37
4.2	OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COCOS NUCIFERA	37
4.3	OBTENÇÃO DA TINTURA-MÃE DE COCOS NUCIFERA	37
4.4	OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES DINAMIZADAS A PARTIR DA TM DE COCOS NUCIFERA	38
4.5	COLORIMETRIA	39
4.6	DENSIDADE RELATIVA	39
4.7	DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO DA TM DE COCOS NUCIFERA	40
4.8	ANÁLISE DE PH	40
4.9	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA EM SÍLICA GEL	40
4.10	ANÁLISE DA TM DE COCOS NUCIFERA POR CLAE	42
4.11	ANÁLISE DA TM DE COCOS NUCIFERA POR CLAE ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (LC-MS)	44
4.12	DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS	45
4.13	ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES	47
4.14	ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA (UV)	51
4.15	ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)	51
4.16	AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULARA - INIBIÇÃO DE TNF-A	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO E DERIVADAS HOMEOPÁTICAS:	56
5.2	COLORIMETRIA	57
5.3	DENSIDADE RELATIVA	60

5.4	ANÁLISE DE PH.....	60
5.5	DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO DA TINTURA MÃE DE COCOS NUCIFERA.....	61
5.6	ANÁLISE EM UV-VIS DA TM DE COCOS NUCIFERA E DERIVADAS HOMEOPÁTICAS.....	62
5.7	ANÁLISE EM INFRA-VERMELHO DA TM DE COCOS NUCIFERA E DERIVADAS.....	66
5.8	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	70
5.9	DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS.....	74
5.10	ANÁLISE DA TM DE COCOS NUCIFERA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	75
5.11	ANÁLISE DA TM DE COCOS NUCIFERA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ESPECTROSCOPIA DE MASSAS (UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS).....	78
5.12	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DA TM DE COCOS NUCIFERA E DERIVADAS HOMEOPÁTICAS.....	84
5.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE COCOS NUCIFERA TM E DERIVADAS HOMEOPÁTICAS.....	93
6	CONCLUSÃO.....	98
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O uso tradicional das plantas medicinais tem direcionado estudos científicos para verificar as atividades biológicas/farmacológicas desempenhadas nos organismos vivos. As pesquisas são importantes para identificar possíveis ações tóxicas e contraindicações das mesmas, e, neste sentido, os medicamentos fitoterápicos têm se mostrado muito efetivos no tratamento de muitas condições diferentes, incluindo o sistema imunológico (SPELMAN et al., 2006).

As evidências históricas, empíricas e científicas demonstram que derivados de plantas medicinais, não apenas constituintes isolados, possuem atividade imunomoduladora. Os imunomoduladores são definidos como uma variedade de agentes que possuem a capacidade de modular ou regularizar determinadas atividades fisiopatológicas. Portanto, os possíveis mecanismos de ação dos medicamentos fitoterápicos no sistema imunológico podem ser geralmente categorizados em dois grupos principais, para suprimir as respostas imunológicas como um tratamento para doenças autoimunes ou para intensificá-las, o que pode ser aplicado em casos de imunodeficiência e infecciosas doenças (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

O coco, *Cocos nucifera* L., é uma importante árvore frutífera, bem distribuída no mundo, especialmente nos países tropicais. Essa espécie e seus derivados como o óleo, a água e o leite são usados na medicina tradicional indiana como antiblenorrágico, febrífugo e para bronquite e gengivite. Além disso, o uso do coco na alimentação e suas aplicações terapêuticas estão documentados nos registros ayurvédicos, datando de mais de 4000 anos (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

No Brasil, essa espécie foi introduzida pelos portugueses a partir de 1553, através da importação da variedade gigante, que, segundo registros, era proveniente das ilhas de Cabo Verde, e por sua vez originária de Sri Lanka ou Índia (SILVEIRA et al., 2002). Por se tratar de uma planta com ampla distribuição nos países tropicais, o fruto tem vários usos populares relatados em diferentes países. No nordeste do Brasil, a população local utiliza o extrato aquoso das fibras do fruto maduro para tratamento de diarreia, artrite e sangramentos (COSTA, et al, 2010). Já na Guatemala, faz-se uso do extrato das fibras da casca como antipirético, para reduzir a inflamação renal, e como pomada tópica para dermatite, abscessos e lesões; enquanto os habitantes de regiões costeiras do Peru utilizam o extrato aquoso da fibra de coco fresco para tratamento de asma, gonorreia e também como diurético (LIMA et al., 2015).

Devido ao uso na medicina tradicional e suas demais atividades biológicas tais como, a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, demonstradas por Silva et al., (2013)

e outros autores, utilizando o extrato aquoso da casca, o *Cocos nucifera* atraiu a atenção de pesquisadores que visavam o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, e com a homeopatia não foi diferente. Em baixas dinamizações, o medicamento homeopático da casca do coco é utilizado como imunomodulador. Nesse contexto, decidiu-se investigar e avaliar a atividade imunomoduladora da tintura-mãe (TM) de *Cocos nucifera* e das derivadas homeopáticas, bem como sua composição química e características físico-químicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a composição fitoquímica da tintura-mãe (TM) e formulações homeopáticas derivadas do mesocarpo de *Cocos nucifera* L. e avaliar a atividade antioxidante e imunomoduladora.

2.2 Objetivos específicos:

- Obter a TM e derivadas homeopáticas do mesocarpo de *C. nucifera*;
- Identificar e caracterizar os componentes da TM de *C. nucifera*, por meio de análises cromatográficas e espectroscópicas;
- Selecionar e quantificar marcadores químicos da TM de *C. nucifera*;
- Obter as características físico-químicas da TM e derivadas por diferentes técnicas;
- Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, por meio de método de sequestro de radical livre DPPH da tintura de *C. nucifera* e derivadas homeopáticas;
- Avaliar a atividade imunomoduladora da TM e de derivadas de *Cocos nucifera* L. em modelo *in vitro* sobre a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 em cultura de células.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Homeopatia

Conceitualmente a homeopatia é um sistema terapêutico que apresenta uma abordagem generalista e integrativa, sendo reconhecida como especialidade médica no Brasil e no mundo (ROLLEMBERG, 2019). Foi desenvolvida e sistematizada pelo médico alemão Samuel Friederick Christian Hahnemann, que nasceu no ano de 1755 em Meissen, Alemanha (BELLAVITE et al., 2005). A homeopatia se fundamenta em quatro pilares principais: a Lei dos semelhantes, a experimentação de medicamentos em indivíduos sadios, a totalidade sintomática e o uso de doses infinitesimais (MONTEIRO, IRIART, 2007; TEIXEIRA, 2017).

A Lei dos Semelhantes representa a base filosófica da homeopatia, inspirada na medicina hipocrática, e tem como lema: o semelhante cura o semelhante ou “*similia similibus curantur*” (MONTEIRO; IRIART, 2007). Hahnemann iniciou seus estudos a partir do fundamento da Experimentação Homeopática, que consiste em experimentar o poder curativo das substâncias medicamentosas em indivíduos sadios e, a partir disso, observar os efeitos produzidos, tanto físicos como emocionais e mentais. Inicialmente, ele utilizava doses ponderais das substâncias, mas observou efeitos conhecidos como agravação homeopática, que consistem na piora momentânea dos sintomas. Com a prática, Hahnemann decidiu experimentar o uso do medicamento diluído e percebeu que à medida que diluía as doses e dinamizava, o efeito curativo persistia e as agravações tendiam a diminuir e desaparecer e assim passou a empregar as doses cada vez mais diluídas, sendo conhecidas como infinitesimais (TEIXEIRA, 2017).

Os registros de efeitos gerados pelas substâncias medicamentosas no indivíduo sadio foram compilados em uma obra chamada Matéria Médica Homeopática. É por meio dela que os médicos se orientam para encontrar o medicamento ideal para cada paciente, pois, no tratamento homeopático, leva-se em consideração a totalidade sintomática. Isto significa que todos os fatores e situações envolvidos na vida do paciente são importantes para o tratamento, pois esse é focado na compreensão do indivíduo dentro do seu contexto e aspecto social e de suas reações diante das agressões (LOCH-NECKEL; CARMIGNAN; CREPALDI, 2010; BELLAVITE et al., 2005). Assim, é na escolha do medicamento individualizado que está a condição inerente para que a reação terapêutica do organismo seja despertada (TEIXEIRA, 2017).

Desde a sua criação, a homeopatia sofreu e vem sofrendo ataques relacionados à comprovação científica de sua eficácia, principalmente devido ao método de preparo dos medicamentos que

consiste em uma técnica de diluição e dinamização por meio de agitações vigorosas dos medicamentos (TEIXEIRA, 2017). Em adição, a Homeopatia também sofreu um golpe pela química, quando a lei formulada por Amedeo Avogadro foi comprovada e publicada em 1909 por Millikan. Esta lei estabelece que cada mol de qualquer substância contém $6,02254 \times 10^{23}$ unidades de moléculas ou átomos. Na homeopatia é comum o uso de potências acima de 24D ou 12CH, que representam diluições homeopáticas que vão além de 10^{24} . Com esta constatação, a ciência moderna colocou em dúvida a homeopatia, pois estas dinamizações provavelmente não apresentam nenhuma molécula ou átomo da substância de partida. (BELLAVITE et al., 2005).

Segundo Schmidt (2014), a medicina convencional considera que além dos homeopatas não utilizarem substâncias médicas materiais, e sim diluições ultra moleculares, a prescrição não é feita apenas com diagnósticos convencionais, baseados em tecnologias objetivas, mas também levando em consideração as queixas e idiossincrasias subjetivas. Dessa forma, o método de prescrição considera o ser, e não a doença, com observação da totalidade sintomática para que se encontre um único medicamento, denominado na homeopatia como *similimum*, cujo efeito terapêutico mais se aproxime dos sintomas apresentados pelo indivíduo (TEIXEIRA, 2017). Apesar disso e da falta de apoio no ensino e pelas autoridades de saúde pública, a homeopatia segue bem difundida por todo o mundo. Seu principal diferencial está na base fundamental: a individualização do doente, que exige um atendimento humanizado, uma vez que se faz necessário compreender o ser, o que está cada vez mais raro nesta era de uma medicina de avanços tecnológicos (BELLAVITE et al., 2005).

Apesar de muito debatida, a homeopatia é uma terapêutica elaborada com base em evidências científicas. Hahnemann era um pesquisador nato, e no desenvolvimento do modelo homeopático teve o cuidado de sempre registrar, e assim, traçar um método científico para descrever os efeitos dos fármacos na fisiologia humana (TEIXEIRA, 2017).

3.1.1 Fundamentos teóricos

Hipócrates, considerado o pai da Medicina, viveu entre os anos 470 – 367 a.C. na Grécia antiga (BELLAVITE et al., 2005). Sabe-se que naquela época existiam duas escolas principais que representavam terapêuticas distintas: Cós e Cnidos. Enquanto na escola de Cnidos a doença e

o doente eram entendidos separadamente, na escola de Cós, não havia doenças e sim doentes, reconhecia-se o paciente como um todo indivisível (ROLLEMBERG, 2019).

Hipócrates de Cós postulou vários princípios em que Hahnemann se fundamentou para a construção da homeopatia. Primeiramente considerava o doente e a doença inseparáveis, também acreditava no poder curativo da natureza, e entendia a doença como perturbação do equilíbrio (ROLLEMBERG, 2019). Na escola de Cós, acreditava-se que o princípio da cura dos doentes era feito pela administração de remédios que produziam sintomas semelhantes aos que o doente apresenta (ROLLEMBERG, 2019). “A cura pelos contrários” foi consolidada por Galeno, no século II, cuja prática se fundamentava no fato de que os medicamentos exercem uma ação contrária à do próprio organismo doente, o que prevalece na medicina ocidental até os dias atuais, sendo a base do que se conhece como alopatia (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

Outro importante precursor de Hahnemann foi Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, também conhecido como Paracelso (1494 – 1541), que além de médico foi alquimista, físico, astrólogo e ocultista (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Paracelso era opositor da "cura pelos contrários" e, por não concordar e combater a ciência clássica, se isolou intelectualmente (BELLAVITE et al., 2005). Propôs a 'Lei das assinaturas' ('signa naturae'), na qual as propriedades terapêuticas dos medicamentos eram 'similares' à sua aparência externa, como por exemplo, os remédios vermelhos eram empregados para doenças do sangue, folhas pontiagudas para a dor causada por facadas, topázio contra icterícia, pois ambos são amarelos (BELLAVITE et al., 2005).

Uma importante contribuição de seu trabalho foi estabelecer o conceito de dosagem, pois naquela época administravam-se quantidades grandes dos medicamentos aos pacientes, resultando em intoxicações. Isso contribuiu para o desenvolvimento de novas técnicas para o preparo de medicamentos, além de introduzir inúmeros medicamentos compostos por substâncias inorgânicas e orgânicas (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

Em sua prática, Paracelso estabeleceu alguns critérios de tratamento que se alinham com o pensamento homeopático, pois seguia a lei dos semelhantes, levando em consideração a totalidade sintomática do paciente. Além disso, era ele mesmo quem preparava os medicamentos, e não acreditava na mistura de substâncias. Julgava que o mais importante eram as características medicamentosas das substâncias e não a dose utilizada. Hahnemann nunca se referiu a Paracelso, mas provavelmente teve contato com sua obra e evitou associar-se a ele por

receio de sofrer ainda mais críticas, já que Paracelso dividia opiniões e sua doutrina era constantemente associada ao ocultismo (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Segundo Bellavite (2005), um verdadeiro antecessor de Hahnemann foi Stoerck (1731-1803). Na década de 1760, ele publicou seus trabalhos relacionando as doenças com venenos de acordo com o princípio de semelhantes. Stoerck fez um valioso questionamento em um de seus trabalhos: *'Se o estramônio causa doenças em alguém com boa mente, induzindo confusão mental, por que não devemos tentar estabelecer se isso pode dar saúde mental a alguém que está confuso ou cujos sentidos são alterados? por doença? Se cura alguém afetado por espasmos, por que não devemos investigar se isso causa espasmos?'* (BELLAVITE et al., 2005; HAHNEMANN, 2007).

Hahnemann, por sua vez, declarou que foi o médico dinamarquês Stahl quem manifestou sua convicção sobre o assunto de maneira mais clara: *“É totalmente errada e às avessas a regra adotada na arte medicinal, de que se devesse curar por meios contrários (contraria contrariis)”* Segundo Hahnemann, (2007) *“ele (Stahl) por sua vez estaria convencido de que por um meio capaz de provocar um mal semelhante (similia similibus) as doenças retrocederiam e seriam curadas.”* e ainda afirma: *“Quão perto estava-se às vezes da grande verdade! Mas eles contentavam-se com apenas um breve pensamento e assim indispensável mudança do antiquíssimo tratamento médico das doenças, das curas inadequadas de até agora para uma arte de curar autêntica, verdadeira e segura ficou não executada até os nossos tempos.”* (HAHNEMANN, 2007).

Certamente, cada um destes profissionais contribuiu enormemente para a concretização do trabalho de Hahnemann, pois, com a colaboração de cada um deles, o criador da homeopatia pode se munir de muito conhecimento para conseguir sistematizar e desenvolver esta nova abordagem terapêutica.

3.1.2 A vida de Hahnemann

Hahnemann sempre foi muito dedicado e estudioso. Sendo plebeu conseguiu apoio por parte de professores para acessar as universidades da época e conseguiu se formar em medicina em 1779. Clinicou por algum tempo, mas logo se frustrou ao perceber que, na verdade, os medicamentos e as medidas terapêuticas da época não promoviam a cura dos enfermos, uma vez que se usavam substâncias com grande potencial tóxico e técnicas como uso de

sanguessugas, sangrias, administração de vomitivos, purgativos e suadores, dentre outros, que resultavam na piora do paciente (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

Por não acreditar nesses tratamentos, Hahnemann desistiu de exercer a medicina e dedicou-se ao ofício de tradutor para sustentar sua família, já que desde sua infância havia aprendido vários idiomas. Foi deste trabalho que Hahnemann resgatou e se aprofundou em uma fonte de conhecimentos, se inspirando a criar e desenvolver esta nova abordagem terapêutica para a medicina. Hahnemann buscou em Hipócrates seus principais fundamentos, mas foi lendo a *Matéria Médica* de Cullen que teve um *insight* e decidiu se aprofundar. Hahnemann observou que os efeitos terapêuticos da quina (*Cinchona officinalis*), empregada para tratar a malária, eram muito semelhantes aos sintomas da própria malária. Decidiu então, experimentar a quina, e observou que desenvolveu os sintomas apresentados por um paciente com malária (ROLLEMBERG, 2019).

Então, seguindo as ideias de von Haller, que recomendava a experimentação da substância medicamentosa na pessoa saudável, antes de ser administrada ao doente, Hahnemann incluiu a si e seus parentes nas experiências, observando e anotando todos os resultados. Atestou que as pessoas saudáveis, desenvolviam os efeitos advindos do medicamento (ROLLEMBERG, 2019) e a partir disso, começou a experimentar outras substâncias, como beladona, digitalis, mercúrio e outros remédios utilizados na época, e a catalogar os resultados. Foi assim, embasado no pensamento hipocrático “*Similia similibus curantur*”, que concebeu uma nova forma de tratamento com pilar principal a Lei dos Semelhantes, a homeopatia (BELLAVITE et al., 2005).

Em 1796, publicou seu primeiro trabalho, com pensamento coerente e sintético: “*Ensaio sobre um novo princípio para descobrir as virtudes curativas das substâncias medicamentosas, seguido de alguns comentários sobre os princípios admitidos até os nossos dias*” (ROLLEMBERG, 2019). Este ano ficou reconhecido como um marco na Homeopatia devido à contribuição de Hahnemann, que então retornou a prática clínica aplicando suas novas ideias e, passo a passo, foi desenvolvendo e aperfeiçoando a homeopatia. Em 1810, publicou a primeira edição do *Organon da Arte de Curar*, que é uma referência para os homeopatas e em 1811, publicou o primeiro volume da *Matéria Médica Pura*, que continha as monografias das drogas testadas até então (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

Em 1812, Hahnemann teve a oportunidade de lecionar na Universidade de Leipzig para estudantes e interessados em seu trabalho, o que foi muito importante, pois conseguiu um grande número de seguidores e, em 1828, publicou outra obra: *Doenças Crônicas*. Segundo

Bellavite, Hahnemann nunca alegou que a homeopatia era o único caminho para a terapia. Ele dizia que o principal método de tratamento é remover a causa fundamental da doença e chamou isso de 'caminho real' ou 'terapia causal' (BELLAVITE et al., 2005). Hahnemann foi aceito e teve seu método utilizado no mundo inteiro, sendo sua obra reconhecida depois de sua morte (1843), em Paris (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Após sua morte, muitos de seus seguidores continuaram sua obra, como Hering e Kent. Hering foi discípulo de Hahnemann e difundiu a homeopatia nos Estados Unidos, onde fundou vários institutos homeopáticos, além de lecionar e escrever a sua *Matéria Médica*. Hering foi o autor das leis de cura que leva seu nome: "Leis de Hering" e que foi exposta pela primeira vez pelo próprio Hahnemann em uma das edições de seu livro *Doenças Crônicas*, em 1845. James Tyler Kent, por sua vez, nasceu em 1849, em Nova York (Estados Unidos) e escreveu vários livros que são utilizados até hoje, tais como *Repertório*, *Matéria Médica*, *Filosofia Homeopática*. Também criou várias técnicas e conceitos, além de um novo modo de pensamento da homeopatia (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

3.1.3 A Homeopatia no Brasil

No Brasil, foi Benoit-Jules Mure, francês, discípulo de Hahnemann, o responsável por disseminar a homeopatia. Ele desembarcou no Brasil em 21 de novembro 1840 e ficou conhecido como Bento Mure e fundou a Escola Homeopática do Rio de Janeiro (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Em 1842, surgiu o Instituto Homeopático em Santa Catarina e a primeira farmácia homeopática do Rio de Janeiro foi inaugurada, fundada por Bento Mure e João Vicente Martins, médico português e primeiro discípulo de Bento Mure no Brasil (RIBEIRO FILHO, 2008).

A homeopatia teve rápida difusão no Brasil, sendo as Forças Militares grande incentivadoras, o que representava apoio do governo ao ensino e suas práticas, tanto que ao final do século XIX, havia alas de homeopatia no Hospital Central Militar e no Hospital da Marinha. Entretanto, com o desenvolvimento da indústria química e farmacêutica nos anos 20, ocorreu um declínio da homeopatia, pois houve um fortalecimento do pensamento médico alopático e grande questionamento acerca da filosofia homeopática (RIBEIRO FILHO, 2008).

Em 1966, no entanto, foi decretada obrigatória a inclusão da Farmacotécnica Homeopática em todas as faculdades de Farmácia do Brasil, e a prática da manipulação homeopática foi regulamentada pelo Decreto 57.477/65, sendo suplementado posteriormente pelo Decreto

78.841/77. Em 1977, foi publicada a primeira edição oficial da Farmacopeia Homeopática Brasileira (FHB) e em 1980, o Conselho Federal de Medicina reconheceu oficialmente a homeopatia como especialidade médica. Em seguida, o Conselho Federal de Farmácia ratificou a farmácia homeopática como privativa da profissão farmacêutica (1986) e posteriormente regulamentou a responsabilidade técnica em farmácia homeopática (1992). A segunda edição da FHB foi publicada 1997, e em 2011, ocorreu a publicação da terceira edição, ambas pelo Ministério da Saúde (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997) (BRASIL, 2019).

Com a criação do sistema único de saúde (SUS), na década de 1980, alguns postos de atendimento disponibilizaram atendimento homeopático como especialidade médica. Mas em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), e assegurou-se ao usuário o acesso à medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia, fitoterapia e termalismo social. Com o objetivo de atender as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa portaria também incentiva e apoia projetos de assistência, ensino e pesquisa homeopática nas diversas esferas do SUS. Nesse contexto, as ações governamentais que seguiram a PNPIC têm essenciais para ampliar o acesso da população à homeopatia e outras práticas integrativas (LOCH-NECKEL; CARMIGNAN; CREPALDI, 2010).

3.2 Medicamentos homeopáticos e análise físico-química

“O método homeopático de cura se desenvolve, para seu uso especial, a um grau até agora nunca visto, os poderes medicinais como que espirituais das substâncias cruas mediante um processo que lhe é peculiar, e que até agora jamais foi tentado, somente pelo qual eles todos se tornam imensurável e penetrantemente eficazes. [...] Essa mudança notável nas qualidades dos corpos naturais desenvolve os poderes dinâmicos latentes, até agora despercebidos, como se estivessem adormecidos, ocultos, que afetam o princípio vital, e alteram o bem-estar da vida animal.” (HAHNEMANN, parágrafo 269 – Organon da arte de curar)

O maior desafio enfrentado pela homeopatia na atualidade é explicar como os medicamentos agem no organismo, já que a técnica de preparação utiliza a diluição seguida da dinamização em série, como estabelecido por Hahnemann, e resulta em um medicamento com quantidades extremamente baixas e muitas vezes imensuráveis da substância ativa. (TEMGIRE et al., 2016). No entanto, mesmo com estes ataques, a homeopatia se tornou uma disciplina médica cada vez

mais popular nos países ocidentais. Atualmente o estudo de drogas em ultradiluições é um novo campo interdisciplinar em ascensão e não pode mais ser presumido como "implausível", pois existe um corpo sólido de trabalho em favor de tais efeitos que foram inicialmente descritos pela tradição homeopática (BELLAVITE *et al.*, 2014).

Os efeitos das soluções ultradiluídas nos levam para fora do domínio da farmacologia clássica, para confrontar fenômenos que podem parecer inexplicáveis. (BELLAVITE *et al.*, 2014). Muitos cientistas têm trabalhado na formulação de hipóteses para explicar como estas soluções dos medicamentos homeopáticos têm ação e várias propostas foram apresentadas para explicar os efeitos pré-clínicos e clínicos das preparações homeopáticas. No entanto, faltam evidências experimentais consistentes para apoiar essas hipóteses (TOURNIER *et al.*, 2021). Algumas das hipóteses sugeridas são a teoria da memória da água (epitaxia), a formação de clusters de nanopartículas, propostas baseadas em aspectos físicos quânticos das soluções e a hipótese de sílica, que propõe a presença de entidades físicas como siloxanos ou silicatos resultantes da lixiviação dos recipientes de vidro (TEMGIRE *et al.*, 2016).

De acordo com levantamento realizado por Klein *et al.* (2018), o maior número de pesquisas em homeopatia publicadas em revistas científicas são da Alemanha, (23%) França, (16%), Índia, (15%) e Itália (14%). As técnicas físico-químicas mais empregadas pelos pesquisadores foram a impedância elétrica, métodos analíticos, espectroscopia ultravioleta, visível, infravermelho e infravermelho por transformada de Fourier, RMN, métodos de imagem, fotografia Kirlian, raios X, fotografia, microscopia, cristalização, microscopia de transmissão eletrônica, calorimetria, eletroquímica, luminescência, cromatografia, espectroscopia Raman e outras técnicas diversas (KLEIN *et al.*, 2018).

Segundo Betti *et al.*, (2013), evidências apontam que seria mais adequado analisar as propriedades físico-químicas das soluções ultradiluídas pela espectroscopia UV, do que o espectro visível ou espectroscopia no infravermelho próximo. Outra abordagem pesquisada é se as soluções ultradiluídas podem compartilhar um mecanismo epigenético comum com a transferência de informação eletromagnética: os agregados de água com um momento dipolar elétrico podem atuar como mediadores de sinais bioeletromagnéticos fracos específicos nas células-tronco alvo, alterando sua proliferação, diferenciação, apoptose ou respostas adaptativas (BETTI *et al.*, 2013). Segundo Tournier *et al.* (2021), as técnicas mais promissoras em termos de qualidade, quantidade da pesquisa gerada e consistência dos resultados foram Ressonância Nuclear Magnética, espectroscopia e impedância elétrica.

Holandino et al. (2017) apresentou um trabalho extenso para avaliar as características físico-químicas de preparações homeopáticas contendo zinco. Nele, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção atômica, a difratometria de raio X, análises térmicas foram realizadas por Calorimetria Exploratória Diferencial, técnica da termogravimetria e ainda realizou a análise dos componentes principais. Os resultados sugeriram que não houve mudanças estruturais devido ao processo de trituração. No entanto, as análises térmicas permitem a diferenciação de grupos dinamizados e não dinamizados, sugerindo que o processo de dinamização foi capaz de induzir um aumento significativo no calor de degradação. Além disso, ao utilizar a análise de componentes principais como ferramenta estatística, é possível sugerir que a presença de zinco afeta a posição dos valores de entalpia de fusão, os quais podem estar correlacionados com mudanças na cristalinidade da amostra e consequente solubilidade (HOLANDINO et al., 2017).

Uma outra abordagem para demonstrar alterações estruturais é a pesquisa de nanopartículas nas soluções ultradiluídas. O grupo de Chikramane et al. (2010), realizou um experimento utilizando as potências 6 CH, 30 CH e 200 CH e selecionou os medicamentos: *Aurum metallicum*, *Cuprum metallicum*, *Stannum metallicum*, *Zincum metallicum*, *Argentum metallicum* e *Platinum metallicum*. Os resultados demonstraram a presença de nanopartículas dos materiais de partida e seus agregados, mesmo em diluições extremamente altas. A presença confirmada de nanopartículas desafia o pensamento atual sobre o papel da diluição em medicamentos homeopáticos. Além disso, apesar das grandes diferenças no grau de diluição de 6 CH a 200 CH (10^{12} a 10^{400}), não houve grandes diferenças na natureza das partículas (forma e tamanho) do material de partida (CHIKRAMANE et al., 2010).

M Van Wassenhoven et al, (2017) utilizou a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uma técnica de pesquisa que investiga e caracteriza as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos e pode determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas nos quais eles estão contidos. Com essa técnica, é possível obter informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica, estado de reação e ambiente químico das moléculas (VAN WASSENHOVEN et al., 2017). A pesquisa desse grupo demonstrou que é possível monitorar os processos de diluição e potencialização por meio de medições de treliça de rotação $1H T1$ e spin e spin $T2$ tempos de relaxamento. Isso fornece evidências de que as soluções não podem ser consideradas água pura e que algumas espécies dissolvidas, nanopartículas e/ou nanobolhas permanecem em todas as diluições.

De acordo com Van Wassenhoven et al., (2017) esse resultado demonstra que a teoria de Avogadro não está de acordo com os dados da pesquisa, para medicamentos preparados homeopaticamente. Ele sugere ainda, que todas as diluições podem ter uma configuração específica do material, influenciada não apenas pela substância potencializada, mas também pela natureza química dos recipientes, pela natureza química dos gases dissolvidos e até pelo ambiente eletromagnético (VAN WASSENHOVEN et al., 2017).

Percebe-se então que, muitos autores têm tentado formular hipóteses e experimentos para explicar a natureza físico-química dos medicamentos homeopáticos quando usados em ultradiluições. A maioria das opiniões converge para a ideia de que há informações não moleculares (ou melhor, 'metamoleculares') impressas na estrutura do solvente (água, ou mistura de água e álcool) que podem interagir através da ressonância com os sistemas de regulação biofísica do organismo alvo (BELLAVITE *et al.*, 2014). Ainda são necessários maiores esforços na construção de modelos, para extrair previsões das diferentes abordagens teóricas e testá-las sistematicamente para progredir em direção a uma hipótese de trabalho mais específica para o modo de ação das preparações homeopáticas (TOURNIER *et al.*, 2021).

3.3 Sistema imunológico

O sistema imunológico compreende um complexo e sofisticado sistema de defesa do nosso organismo. Ele envolve uma série de fatores para seu funcionamento, como as barreiras físicas, químicas, físico-químicas, sistema fagocítico, citotoxicidade mediada por células citotóxicas (células NK), moléculas circulantes (anticorpos e complemento) e mediadores solúveis produzidos pela ativação das células (citocinas), além de linfócitos T e B antígeno-específicas (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

A resposta imunológica é fundamental para a defesa do organismo contra agentes infecciosos e representa o principal impedimento para ocorrência de doenças infecciosas disseminadas (MACHADO et al., 2004). Assim, a partir de um estímulo, seja uma reação inflamatória tecidual ou uma interação entre o sistema imunológico e um agente infeccioso, é desencadeada uma série de reações em nosso organismo visando a proteção do hospedeiro e, se for o caso, a eliminação do microrganismo (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

A função imunológica se divide em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata tem uma resposta mais rápida e se constitui de barreiras física, química e biológica, células

especializadas e moléculas solúveis e é independente de contato prévio com os agentes agressores (CRUVINEL et al, 2010). A inflamação representa um dos principais mecanismos da imunidade inata, sendo a resposta de um organismo à infecção, ação do antígeno ou lesão tecidual, e tem como objetivo erradicar o agente irritante e acelerar a regeneração do tecido (ZELOVÁ; HOŁEK, 2013). O processo inflamatório inicia-se com a liberação de uma série de fatores pró-inflamatórios, que irão mediar o recrutamento e ativação de leucócitos para o tecido inflamado (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

A imunidade adaptativa apresenta uma resposta mais lenta, acionada caso a imunidade inata seja insuficiente para proteger o organismo contra a invasão de agressores; em contrapartida é mais específica já que envolve a memória celular. Esta compreende a resposta imune humoral, a produção e liberação de anticorpos por linfócitos B, que facilitam a fagocitose, e a resposta imune celular, que envolve mecanismos especializados de citotoxicidade mediada por linfócitos e ativação de macrófagos pelas células T efectoras (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Os macrófagos são eficientes células fagocíticas, com importante papel na inflamação, e atuam como células apresentadoras de antígenos e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-12, TNF- α e quimiocinas.

3.3.1 O sistema imune na inflamação aguda

Na inflamação aguda, há a predominância da imunidade inata, com maior atividade dos neutrófilos e macrófagos. A liberação das citocinas pró-inflamatórias desencadeiam a cascata de defesa, promovendo a migração celular que ocorre por ativação das células endoteliais dos vasos sanguíneos que, por sua vez, expressam substâncias de adesão (CRUVINEL et al, 2010). Além disso, estas citocinas atuam no hipotálamo produzindo febre, que inibe a multiplicação bacteriana e estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem óxido nítrico, substância tóxica para as bactérias (MACHADO et al., 2014).

As citocinas compreendem um grande grupo de proteínas extracelulares que atuam como chaves intercelulares com ações reguladoras e mobilizadoras e por isso desempenham papel imprescindível na imunidade (SPELMAN *et al.*, 2006). Essas citocinas mantem a estabilidade fisiológica do organismo por comunicações cruzadas intermoleculares por meio de células secretoras que podem ser estimuladas por alguma lesão tecidual. Em contrapartida, reconhece-se na literatura médica atual que doenças podem ser causadas pela secreção desequilibrada dessas mesmas citocinas (SHARMA, 2017).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), nesse contexto, representa uma das famílias de citocinas muito importante para o processo inflamatório. É um fator pró-inflamatório liberado rapidamente após estímulos inflamatórios que desencadeia efeitos intracelulares como a ativação da produção de outras citocinas, quimiocinas e proteases, que levam à ativação do sistema imunológico (HENRIQUES *et al.*, 2016). Uma outra citocina importante é o interferon gama (IFN- γ), produzida principalmente por linfócitos Th1 e células *natural killer* (NK), que ativa macrófagos, que por sua vez, produz outras citocinas protetoras, como o TNF- α , e metabólitos tóxicos para o parasita, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ABUD *et al.*, 2006).

Outro fator importante que contribui com o desenvolvimento do processo inflamatório é a produção descontrolada de radicais livres. Radicais livres são espécies químicas, altamente reativas, pois são capazes de receber ou doar elétron e se formam com o próprio metabolismo humano. O organismo dispõe de um sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Entretanto, quando ocorre o desequilíbrio entre esse sistema, estabelece-se o estresse oxidativo e conseqüentemente seus efeitos prejudiciais, como peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e de membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, ocasionando uma série de patologias (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os antioxidantes, nesse sentido, são substâncias que retardam ou inibem a oxidação do substrato. A reação de um radical com uma substância antioxidante resulta em um produto estável (SOUSA *et al.*, 2007).

Para manter um equilíbrio na resposta imunológica, o sistema imune possui um mecanismo de autorregulação formado por células capazes de estimular ou suprimir respostas imunológicas por meio da liberação de substâncias imunomoduladoras. Nesse contexto, atualmente é possível manipular o sistema imune através da administração de fármacos imunomoduladores, de acordo com a necessidade do paciente (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003) (ABUD *et al.*, 2006).

3.3.2 TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, com atuação na inflamação aguda e crônica, doenças autoimunes, infecção e no controle de proliferação, diferenciação e apoptose celular (PALLADINO *et al.*, 2003). TNF- α pode ser liberado por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos e é liberado rapidamente após estímulos inflamatórios, principalmente na presença de lipopolissacarídeos, que compõem a membrana das bactérias gram-negativas (HENRIQUES *et al.*, 2016). O principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta

imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, e ativá-los (VITALE; RIBEIRO, 2007).

É uma citocina conhecida como um poderoso ativador do fator de transcrição nuclear NF- κ B (NF- κ B), (PALLADINO *et al.*, 2003), pois se liga a receptores específicos e estimula a transcrição e a produção da enzima I κ B quinase, a qual irá produzir esse fator. O NF- κ B, quando ativado, irá agir no núcleo da célula, induzindo a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF- α (VITALE; RIBEIRO, 2007).

Em baixas concentrações, o TNF- α age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretar um grupo de citocinas, denominadas quimiocinas. Essas apresentam ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo um processo inflamatório local, que possibilita o combate a quadros infecciosos. No hipotálamo, o TNF- α age como pirógeno endógeno, induzindo febre, e no fígado, estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio. A superprodução do TNF- α está associada a diferentes doenças inflamatórias crônicas (VITALE; RIBEIRO, 2007).

3.3.3 Atividade antioxidante e sistema imune

O termo "radicais livres" é atribuído a moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, por isso os radicais livres são altamente instáveis, apresentam meia vida curta e são muito reativos quimicamente. Duas das famílias de radicais livre são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BRAMBILLA *et al.*, 2008). Sabe-se que os radicais livres são responsáveis pelo envelhecimento e por doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUSA *et al.*, 2007). Quando a produção é excessiva, e o organismo não consegue equilibrar as espécies reativas, ocorrendo o estresse oxidativo, com isso, os radicais livres atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, levando a um processo de peroxidação lipídica na membrana celular, ocasionam danos em proteínas, DNA e lipídios (BRAMBILLA *et al.*, 2008).

Os antioxidantes, então, são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células e por isso compõem o sistema de defesa fisiológica

para combatê-los. Existem sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos como catalase, glutathione redutase e superóxido dismutase, glutathione, urato e coenzima Q e também fatores exógenos como β -caroteno, vitamina C, vitamina E, selênio e substâncias fenólicas (BRAMBILLA et al., 2008). Quando há restrição na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas, oferecendo maior risco ao desenvolvimento de resposta inflamatória (SOUSA et al., 2007).

Sabe-se que a exposição celular a EROs e a alteração no sistema redox, resulta no desencadeamento do processo de transcrição de genes inflamatórios e nos fatores de transcrição regulados por meio mecanismos sensíveis ao sistema redox. As EROs ativam o NF-kB e com isso várias citocinas pró-inflamatórias são produzidas em excesso, como o TNF- α e interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 12. Como resultado da ação dessas citocinas, pode ocorrer a formação de mais EROs, o que estabelece um ciclo vicioso entre o estresse oxidativo e a geração de citocinas pró-inflamatórias (SOARES *et al.*, 2015). Durante o processo inflamatório também ocorre a produção de grandes quantidades de radicais livres catalisado pela enzima NADPH oxidase, envolvida no processo de fagocitose (BRAMBILLA et al., 2008).

As substâncias fenólicas, nesse contexto, se destacam por sua atividade antioxidante, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. Nas plantas, os fenólicos estão presentes como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas, ligninas, entre outros. Essas substâncias possuem anéis aromáticos e hidroxilas que favorecem a formação de intermediários estáveis. Assim, as propriedades redutoras e a estabilização proporcionada pela estrutura química atuam na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, sendo responsáveis por essa atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

3.4 *Cocos nucifera* L.

Cocos nucifera L. é uma planta nativa do sudeste Asiático e das ilhas entre os oceanos Índico e Pacífico (LIMA et al., 2015). Trata-se de uma árvore frutífera, típica de países tropicais. No Brasil, distribui-se ao longo da faixa costeira e é conhecido popularmente como coqueiro ou coco-da-bahia. Há evidências de que o coqueiro foi introduzido no Brasil pelos portugueses, em 1500, e os primeiros relatos constam no “*Tratado Descritivo do Brasil*”, escrito por Gabriel Soares de Souza em 1587 (SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002). Dentro do gênero *Cocos*, distinguem-se duas variedades principais: variedade *typica* Nar. (variedade

gigante) e variedade nana Griff (variedade anão) (SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002).

O tipo gigante cresce lentamente e os frutos são produzidos de 6 a 10 anos após o plantio. A copra, óleo e fibra são de boa qualidade e comparativamente é mais resistente, com vida de 80 a 120 anos. Já a variedade anão, popularmente conhecida no Nordeste como “olho-de-cravo”, apresenta um crescimento mais rápido e produz seus frutos em 4 a 5 anos. Este tipo não é tão resistente, requer um clima favorável e solo adequado para seu desenvolvimento (RINALDI *et al.*, 2009; DEBMANDAL; MANDAL, 2011). A variedade mais difundida no país, porém, é a gigante ou comum. (RINALDI *et al.*, 2009).

Na figura 1, é possível verificar que o fruto do coco compreende um epicarpo externo, um mesocarpo e um endocarpo interno. O epicarpo é a casca externa do fruto; o mesocarpo, é pesado, fibroso e aspecto bronzeado quando seco; o endocarpo é o núcleo duro e escuro. Em seu interior existe um albúmen sólido, branco, de espessura variada, dependendo da idade do fruto, e com consistência de polpa oleosa; e um albúmen líquido, denominado água de coco, que é espesso, doce e levemente ácido (LIMA *et al.*, 2015).

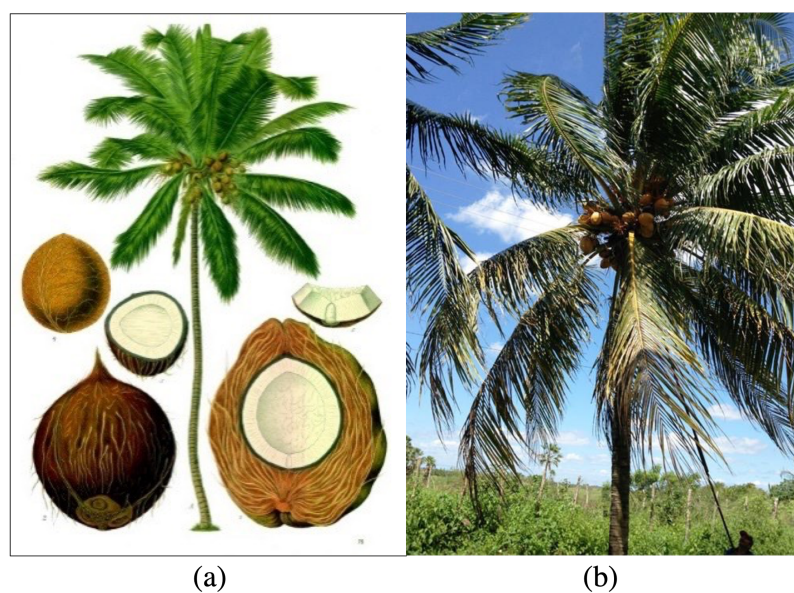


Figura 1. *Cocos nucifera* (a) fruto de *Cocos nucifera* (imagem por Franz Eugen Köhler) (b) parte aérea (imagem por Lima *et al.* 2015).

Por se tratar de uma planta de ampla distribuição nos países tropicais, *Cocos nucifera* tem vários usos populares relatados em diferentes países, como descrito na tabela 1.

Tabela 1. Usos tradicionais descritos para *C. nucifera* de acordo com o país

País	Uso tradicional	Parte Utilizada	Referência
Brasil	Diarreia, artrite e sangramentos	Extrato aquoso das fibras do fruto maduro	COSTA, <i>et al</i> , 2010
	Teniase, esquistossomose e ancilostomose	Polpa do coco	COSTA, <i>et al</i> , 2009
Caribe, Gana e México	Infecções intestinais e diarreia	Leite de coco	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Fiji	Queda de cabelos	Óleo de coco	LIMA <i>et al.</i> , 2015
	Doenças renais	Água de coco	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Guatemala	Antipirético, antiinflamatório renal, e como pomada tópica para dermatite, abscessos e lesões.	Extrato das fibras da casca	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Haiti	Asma	Extrato das fibras do fruto	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Índia	Afrodisíaco, diarreia, disenteria, diabetes, lepra, debilidades gerais e distúrbios do ciclo menstrual	Suco da inflorescência fresca	NASKAR <i>et al.</i> , 2011
	Micose	Óleo de coco	EZQUENAZI <i>et al</i> , 2002
	Hidratação e proteção do TGI de infecções; gastroenterites, cálculos renais e doenças coronárias	Água de coco	MANDAL <i>et al</i> , 2008
Indonésia	Contraceptivo oral	Leite de coco	LIMA <i>et al.</i> , 2015
	Feridas	Óleo de coco	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Jamaica	Febre e diarreia	Extrato da raiz	LIMA <i>et al</i> , 2015
	Diabetes	Extrato das fibras do fruto	LIMA <i>et al.</i> , 2015
Malásia	Malária	Decocção da polpa	AL-ADHROEY <i>et al</i> , 2010
Papua Nova Guiné	Diarreia e dor de estômago	Folhas e raízes (mastiga-se)	LIMA <i>et al</i> , 2015
Perú	Asma; Diurético e tratamento de gonorreia	Extrato aquoso da fibra de coco fresco	LIMA <i>et al.</i> , 2015

3.3.1.1 Composição química

A partir de estudos fitoquímicos da fibra do coco, seu extrato etanólico mostrou a presença de fenóis, como taninos, leucoantocianidinas, flavonoides, além de triterpenos, esteroides e alcaloides; e no extrato butanólico, triterpenos, saponinas e taninos condensados (LIMA *et al*, 2015). Outro estudo mostrou a presença de taninos, como catequina, e flavonoides (ROOPAN, 2016) e o extrato liofilizado da fibra de *C. nucifera* mostrou-se rico em polifenóis, compostos como catequinas, epicatequinas, taninos e flavonoides (LIMA *et al*, 2015).

No albúmen líquido foram identificados os seguintes constituintes: ácido nicotínico, ácido pantotênico, biotina, riboflavina, ácido fólico, com traços de vitaminas B1, B6 e C, aminoácidos, L-arginina, hormônios vegetais, enzimas e fatores de promoção do crescimento.

Já o óleo extraído do albúmen sólido mostrou-se rico em ácido láurico e alfa tocoferol, enquanto da raiz foram identificados flavonoides e saponinas (LIMA et al, 2015).

Os resultados do trabalho de DEY et al. (2004) demonstraram que, de acordo com idade do fruto, se verde ou maduro, as concentrações de substâncias ativas encontram-se diferentes. E apesar das diferenças quantitativas, foram identificadas as seguintes substâncias no extrato das fibras do coco: ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 4-cumárico e ácido ferúlico. Oliveira e colaboradores (2021) identificaram também o ácido 4-hidroxibenzóico, além de outros fenólicos como ácido clorogênico, vanílico, cafeico e o flavonoide quercetina, catequina e epicatequina.

Outro estudo demonstrou que o fruto de *C. nucifera* possui fibras da casca rica em substâncias polifenólicas, como taninos, dentre eles catequina e epicatequina, substâncias com potente atividade antioxidante, anticancerígena, antimutagênica, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (MENDONÇA-FILHO et al, 2003). Arivalagan e colaboradores (2018), recentemente descreveram a desrepliação de 28 substâncias, dentre elas ácidos fenólicos do tipo C6C3 como ácido cafeico, clorogênico, ferúlico, o-cumárico, p-cumárico, trans-cinâmico e sinapico e do tipo C6C1 como o ácido 2,4-dihidroxibenzoico, gálico, gentísico, 4-hidroxibenzóico, protocateculico, salicílico, siringico, vanílico e 3-hidroxibenzóico, além dos flavonoides: apigenina, catequina, hesperitina, canferol, leutoline, mircetina, neringenina, quercetina, rutina, epicatequina, epigalocatequina e a cumarina umbelliferona (Figura 2).

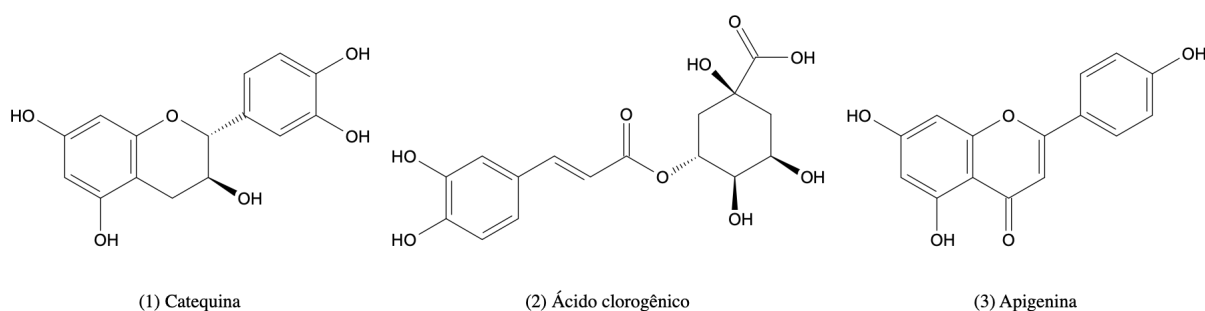


Figura 2. Estruturas químicas de algumas substâncias já isoladas de *C. nucifera*.

3.3.1.2 Atividades farmacológicas observadas

Muitos estudos têm sido realizados para identificar as substâncias ativas no coco e suas possíveis atividades farmacológicas e biológicas. A tabela 2, representa um resumo das

atividades farmacológicas de extratos, frações e substâncias isoladas de diferentes partes da espécie (LIMA et al, 2015).

3.3.1.3 Toxicologia

A toxicidade de *Cocos nucifera* foi investigada em alguns estudos e não demonstraram manifestações de toxicidade, sendo considerado seguro (LIMA et al, 2015). Em estudo orientado por Nunes-Pinheiro et al., (2009), o extrato de *C. nucifera* mostrou-se seguro para utilização, pois por meio de monitoramento dos parâmetros fisiológicos e aspectos macroscópicos dos órgãos linfoides, não houve mortalidade, nem qualquer sintoma de toxicidade sobre os animais estudados (NUNES-PINHEIRO et al., 2009).

Costa et al. (2011) constatou que na toxicidade aguda, o extrato butanólico da casca de *C. nucifera* administrado por via oral apresentou baixa toxicidade. Com relação a toxicidade subcrônica e crônica o mesmo extrato butanólico da casca do coco verde, mostrou-se seguro, pois observou-se que não houve grandes alterações na contagem de células sanguíneas. Ao contrário, observou-se um aumento nos valores de leucócitos, neutrófilos, hemácias, hematócrito e plaquetas do grupo tratado com *C. nucifera*. Esse resultado é indicativo de uma possível atividade imunomodular. Além disso, não foram observadas alterações das funções hepáticas e renal, assim como não houve diferença estatística entre os pesos dos grupos (COSTA et al., 2011).

Tabela 2. Atividades Farmacológicas de extratos e frações de *Cocos nucifera* L..

Parte utilizada para extrato	Solvente	Atividade Biológica	Referência
Mesocarpo	Aquoso	Antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, redução dos níveis de citocinas, como TNF-a	SILVA et al., 2013
		Atividade antineoplásica	KIRSZBERG et al., 2003 KOSCHEK et al., 2007
	Etanol	Atividade antinociceptiva periférica e central Antimicrobiano contra <i>Microsporum canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. audouinii</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i> e <i>T. violaceum</i>	RINALDI et al., 2009 LIMA et al, 2015
		Antibacteriano contra <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Alteromonas sp.</i> e <i>Gallionella sp.</i>	VIJU; SATHEESH; VINCENT, 2013
		Atividade antiviral (<i>Herpes simplex</i>)	ESQUINAZI et al., 2002
		Anti-hipertensivo em ratos hipertensos	BANKAR et al., 2011

	Fração acetato de etila	Antimicrobiano contra <i>Plasmodium falciparum</i> <i>in vivo</i> contra <i>P. berghei</i> NK65	AL-ADHROEY et al., 2011
	Butanol	Anti-helmíntica,ovicida e larvicida contra <i>Haemonchus contortus</i>	COSTA et al., 2010
	Extrato rico em polifenóis	Anti-protozoário em <i>Leishmania amazonenses</i>	MENDONÇA-FILHO et al., 2004
	Metanol	Antitricomonal em <i>Trichomonas vaginalis</i>	LIMA et al., 2015
		Antioxidante e Antimicrobiana contra <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> .	CHAKRABORTY; A MITRA, 2008
Água de coco		Ação na nefrolitíase e urolitíase	GANDHI et al., 2013
		Hipocolesterolêmico	PREETHA et al., 2013
Óleo virgem		Anti-inflamatória	ROOPAN, 2016
		Antifúngico contra <i>Candida albicans</i>	LIMA et al., 2015
Inflorescência da fibra de casca	Metanol	Hipoglicêmico	RENJITH et al., 2013
Raiz	Metanol	Depressor do Sistema Nervoso Central e Anticonvulsivante	LIMA et al., 2015
Extrato da casca		Atividade antibiofilme	VIJU; SATHEESH; VINCENT, 2013

4 MÉTODOS

4.1 Local de realização

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacognosia e Homeopatia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 Obtenção e identificação de *Cocos nucifera*

O fruto fresco, *Cocos nucifera* L., foi adquirido no estabelecimento comercial “Super Mais”, localizado na Rua Ponte Nova, 783, bairro Floresta, Belo Horizonte em dezembro de 2018. Após aberto, fragmentou-se o mesocarpo para produção da TM. Uma amostra foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais sob a identificação BHC205000. O registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) recebeu o código AEF8D2.

4.3 Obtenção da Tintura-mãe de *Cocos nucifera*

A TM de *Cocos nucifera* a 10%, foi preparada de acordo com a Metodologia Geral para a preparação de TM presente na Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª ed. (2011).

4.3.1 Determinação do resíduo sólido de vegetal fresco

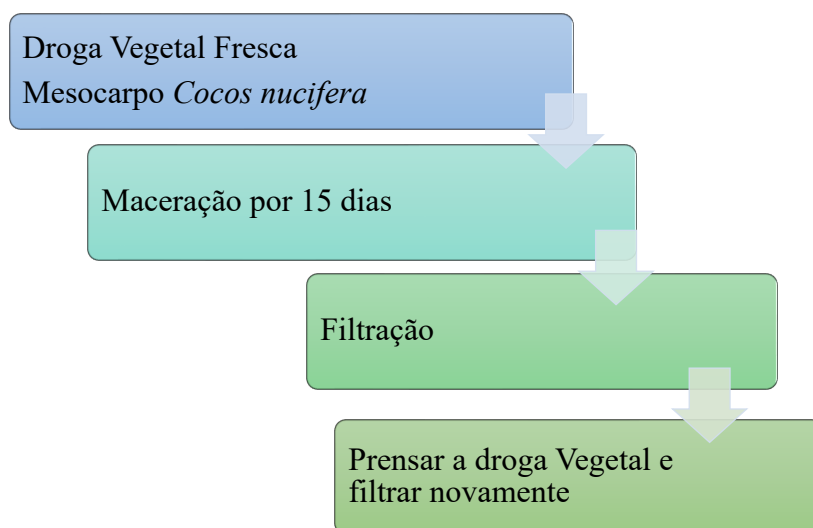
Para a determinação do resíduo sólido e obtenção da TM, 101 g do mesocarpo fresco foi fragmentado e levado em estufa à temperatura entre 100 °C e 105 °C, até peso constante (t = 220 min). A porcentagem do resíduo sólido foi calculada, e, em sequência, o teor alcoólico da TM foi calculado (BRASIL, 2011).

4.3.2 Processo de maceração

Para obtenção da TM, utilizou-se 500 g do mesocarpo fresco fragmentado de *Cocos nucifera* e 1L de solução hidroalcoólica a 90% p/p (Etanol 96°GL), pelo processo de maceração, conforme fluxograma 1. O mesocarpo fresco foi colocado em recipiente fechado, por 15 dias, em contato com o volume total do líquido extrator em ambiente protegido da ação direta de luz e calor. O recipiente foi agitado diariamente. Após 15 dias, a tintura foi filtrada e o resíduo prensado e

filtrado novamente. A TM obtida foi armazenada em frasco âmbar e longe de incidência solar e calor (FHB, 2001). Para algumas análises a TM foi seca utilizando inicialmente rotaevaporar e capela com exaustor para evaporação de resíduos finais dos solventes (BRASIL, 2011).

Fluxograma 1. Processo de Maceração para produção da TM de *Cocos Nucifera*



4.4 Obtenção de soluções dinamizadas a partir da TM de *Cocos nucifera*

A obtenção das soluções dinamizadas foi realizada por método farmacopeico da Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª ed. (2011). Foram preparadas soluções dinamizadas nas escalas centesimal e decimal, ou seja, diluições 1:100 e 1:10. Para obtenção das soluções dinamizadas, partiu-se da TM, sendo que para as três primeiras dinamizações, na escala centesimal e nas seis primeiras para a escala decimal, empregou-se o etanol com o mesmo teor alcoólico da tintura-mãe (etanol 90%). Para estocar e preparar as demais formas derivadas utilizou-se etanol a 77% (v/v) ou superior.

Para a dinamização, a sucussão foi realizada de forma mecânica com o dinamizador AUTIC para obter as matrizes dinamizadas de CH1 a CH30 e DH1 a DH30, seguindo a seguinte técnica:

Em cada frasco, foi adicionado volume de insumo inerte (etanol 77% v/v) na proporção indicada, conforme escalas decimal ou centesimal, observando que o volume ocupado no frasco deve ser de 1/2 a 2/3 da capacidade do frasco utilizado na preparação. Em seguida, acrescentou-se 1 parte da TM de *Cocos nucifera* em 9 partes no 1º frasco, para

a escala decimal, ou 99 partes do insumo inerte (etanol a 77% v/v) para a escala CH. Em seguida, a solução foi sucussionada 100 vezes, obtendo-se assim a 1 DH ou 1 CH.

Desta primeira dinamização, transferiu-se para um novo frasco 1 parte da 1 DH em 9 partes do insumo inerte ou 1 parte da 1 CH em 99 partes do insumo inerte (etanol a 77% v/v). Sucussionou-se mais 100 vezes, obtendo-se assim a 2 DH ou 2 CH. Essa sequência de dinamização e sucussão foi repetida até a potência desejada (BRASIL, 2011).

4.5 Colorimetria

Os parâmetros de coloração da TM e derivadas homeopáticas CH1, CH3, CH6 e D1, D3 e D6 foram avaliadas, em triplicata, em espectrofotômetro (Konica Minolta, CM-2300d, Tóquio, Japão), equipado com a escala CIELab. As amostras foram colocadas em placas de Petri em quantidade necessária para preencher toda a placa. Colocou-se a placa sobre uma base fixa branca, e em seguida, a luz foi incidida pelo espectrofotômetro e a leitura realizadas pelos valores de L A B. A partir dos resultados dos parâmetros colorimétricos L* (luminosidade), a* (vermelho a verde) e b* (amarelo a azul) das amostras, os dados foram avaliados e discutidos (KONICA MINOLTA, 2015).

4.6 Densidade Relativa

A densidade relativa da TM foi determinada pelo método do picnômetro, como preconizado na Farmacopeia Brasileira (2019). Utilizou-se picnômetro de 25 mL, previamente calibrado, que foi limpo, seco e pesado com a tampa, obtendo-se o peso inicial (Pi). Posteriormente, o picnômetro foi pesado com as respectivas amostras, obtendo-se o assim o peso final (Pf). Após as pesagens calculou-se a densidade pela fórmula: $D = \frac{Pi - Pf}{volume}$. O experimento foi realizado a temperatura de 20 °C com cada amostra separadamente, em triplicata.

O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C, é a densidade relativa (d_{20}^{20}). Calculou-se a densidade de massa (ρ_{20}), expressa em g/mL, a partir da expressão: $\rho = (0,99703 \times d_{20}^{20}) + 0,0012$ (BRASIL, 2019).

4.7 Determinação de resíduo seco da TM de *Cocos nucifera*

Pesou-se 2 g da TM de *Cocos nucifera* L, em triplicata, evaporou-se à secura em banho de maria, e, em seguida, secou-se em estufa entre 100 °C e 105 °C durante 3h. As amostras foram colocadas em dessecador contendo gel de sílica e, posteriormente, foram pesadas. O resultado foi expresso em porcentagem m/m ou em g/L (BRASIL, 2019).

4.8 Análise de pH

Para a determinação do pH, 2,0 mL da TM de *Cocos nucifera* L foram medidos e transferidos para erlenmeyer. Adicionou-se 18,0 mL de água purificada à TM, agitando por 10 minutos, e procedeu-se à medição do pH da dispersão aquosa obtida, em triplicata, em potenciômetro previamente calibrado (BRASIL, 2019).

4.9 Cromatografia em Camada Delgada em sílica gel

Realizou-se a análise e prospecção fitoquímica da TM de *Cocos nucifera*, por cromatografia em camada delgada (CCD). Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD para a avaliação de taninos, flavonoides e triterpenos/esteroides. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ sobre alumínio e a eluição realizada em cubas cromatográficas de vidro saturada com a fase móvel. A fase móvel utilizada foi acetato de etila, hexano, ácido fórmico e água (80:10:5:5). Após a eluição da cromatoplacas as mesmas foram removidas, secas ao ar e examinadas sob luz ultravioleta (UV) ou visível ou com a utilização de soluções reveladoras.

4.9.1 Preparo das soluções reveladoras

Solução de Cloreto de Alumínio a 5% metanol (m/v): dissolveram-se 5,0g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol.

Solução de cloreto férrico a 2 % m/v: dissolveram-se 2 g de FeCl₃ em 100 mL de etanol.

Anisaldeído sulfúrico: dissolveram-se 0,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial. Em seguida, adicionaram-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado; a solução foi preparada à frio, em banho de gelo; os reagentes foram adicionados, respectivamente, na ordem mencionada.

Reagente Lieberman–Burchard: Adicionaram-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado à 10 mL de anidrido acético.

4.9.2 *Identificação de flavonoides e polifenóis*

Solubilizou-se exatamente 0,07 g do resíduo seco da TM de *Cocos nucifera* em 1000 µL de metanol, com o auxílio de banho de ultrassom, por 15 minutos. Utilizou-se a solução resultante para a realização de análise por CCD.

- Fase móvel: acetato de etila, hexano, água e ácido fórmico (80:10:5:5).
- Reveladores: UV λ 254 e 365 nm, cloreto de alumínio 5% m/v e cloreto férrico a 1% p/v.
- Substâncias de referência: Rutina (R), Quercetina (Q), Apigenina (Api), Ácido cafeico (ACF) e Ácido clorogênico (ACL) (Sigma-Audrich (soluções a 1 mg/mL em metanol).
- Identificação: flavonoides se apresentam como manchas de cor amarela, azul ou verde em UV λ 365 nm. O cloreto de alumínio aumenta a fluorescência no comprimento de onda utilizado.

4.9.3 *Identificação terpenos e esteroides*

Utilizou-se as mesmas soluções de amostra preparadas para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: acetato de etila, hexano, água e ácido fórmico (80:10:5:5).
- Reveladores: anisaldeído sulfúrico e reagente de Libermman–Burchard, seguido de aquecimento a 100 °C até o aparecimento das manchas.
- Substância de referência: catequina (Cat), epicatequina (Ect), ácido caféico (Acf), ácido ferúlico (Afr) e ácido clorogênico (Acl) (Sigma-Audrich (soluções a 1 mg/mL em metanol).
- Identificação com anisaldeído: É um reagente universal para produtos naturais, que possibilita a diferenciação de cores e facilita a visualização de terpenos e esteroides, (JORK, FUNK, *et al.*, 1990).
- Identificação Libermman–Burchard: manchas pardas a vermelhas ou róseas escuras

indicam resultado positivo para triterpenos pentacíclicos livres. Manchas azuis que mudam pra um verde persistente indicam a presença de esteróis livres.

4.9.4 Identificação de taninos

Utilizou-se as mesmas soluções de amostra preparadas para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: Acetato de Etila, Hexano, Água e ácido fórmico (80:10:5:5).
- Revelador: solução de cloreto férrico a 1% m/v.
- Substância de referência: Catequina (Cat), Epicatequina (Ect), Ácido cafeico (Acf), Ácido ferúlico (Afr) e ácido clorogênico (Acl) (Sigma-Audrich (soluções a 1 mg/mL em metanol)).
- Identificação: taninos se apresentam como manchas negro azuladas ou negro esverdeadas no visível e UV λ 254 e 365 nm.

4.10 Análise da TM de *Cocos nucifera* por cromatografia líquida de alta eficiência

4.10.1 Preparo da amostra

A TM de *Cocos nucifera* foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de UV. O resíduo seco da TM foi dissolvido em metanol grau CLAE com o auxílio de ultrassom e posteriormente filtrada (0,45 μ m) diretamente para um *vial* de 2 mL para análise por CLAE.

4.10.2 Preparo das Substâncias de referência

As substâncias de referência (ácido cafeico, catequina, epicatequina, epigalocatequina, ácido clorogênico, vanilina) foram pesadas separadamente, diretamente para microtubos plásticos do tipo *safe-lock*, seguindo de solubilização em 1 mL de metanol grau CLAE, em concentração final de 1,0 mg/mL. As soluções foram submetidas à solubilização em banho ultrassom por 10 minutos e em seguida filtradas (0,45 μ m). Injetaram-se automaticamente, alíquotas de 10 μ L de cada solução de referência no sistema cromatográfico.

4.10.3 Condições cromatográficas

A fim de obter perfis cromatográficos por CLAE foram preparadas soluções utilizando 10 mg do resíduo da TM de *Cocos nucifera* em 1 mL de metanol grau CLAE e soluções derivadas nas escalas centesimal e decimal. A dissolução da TM foi realizada com o auxílio de um banho de ultrassom por 15 minutos. Após esse tempo, as soluções obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para *vials* de vidro de 2 mL. Utilizou-se sistema CLAE, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjo de diodos 2998, bomba e injetor Alliance 2695, e programa Empower para processamento de dados. Os perfis foram obtidos utilizando coluna de fase reversa e detector de arranjos de diodo (CLAE-FR-DAD). Foi utilizada coluna Lichrospher® 100 18 RP (partículas de 5 µm, 125 x 4mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e fluxo de 1mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. Foram injetados 10 µL de cada solução e o fluxo foi de 1 mL/minuto. A leitura foi realizada em λ 335 nm sendo registrados numa faixa espectral de λ 200 a 600 nm.

A fase móvel empregada consistiu em gradiente linear utilizando água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fosfórico e acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico em 45 minutos conforme tabela 3. As análises foram realizadas nas condições cromatográficas de Nascimento et al., 2013: 1% de ácido fosfórico e acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico em gradiente linear de 5 a 40% em 60 min em 40 °C, na mesma coluna cromatográfica descrita acima. As substâncias de referência foram injetadas nas mesmas condições cromatográfica: ácido gálico, vanilina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, epigalocatequina, procianidina B2 e A2, apigenina, quercetina e rutina (Sigma-Aldrich). Foram realizados também experimentos de coinjeção na TM de *C. nucifera*, adicionando-se 100 µL de solução de 1 mg/mL de cada padrão, separadamente, na solução metanólica a 10 mg/mL da TM preparada para injeção no cromatógrafo.

Tabela 3. Gradiente de eluição para análise por CLAE da tintura de *Cocos nucifera*.

Tempo (minutos)	H ₂ O + 0,1% H ₃ PO ₄ (%)	ACN +0,1% H ₃ PO ₄ (%)
0,0	95	5
60,0	60	40
65,0	60	40
70,0	95	5
75,0	95	5

Nota: ACN = acetonitrila

4.11 Análise da TM de *Cocos nucifera* por CLAE acoplada a espectroscopia de massas (LC-MS)

Para verificar a composição química da TM de *Cocos nucifera* foi utilizada a técnica de CLAE/LC-MS. O experimento foi realizado no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelo Professor Rodrigo Rodrigues de Oliveira. A análise UPLC foi realizada em um instrumento Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão) equipado com um desgaseificador, bomba binária, amostrador automático, forno de coluna com temperatura controlada e DAD. A separação foi realizada em uma coluna analítica C-18 Zorbax (1,7 μm , 2,1 mm \times 75 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

A fase móvel consistiu em água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (B). O seguinte gradiente de eluição foi utilizado após otimização do procedimento e se encontra descrito na tabela 4. O fluxo foi mantido a 0,25 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 40°C. O volume de injeção foi de 20 μL . O UV/DAD foi monitorado em λ 220 nm (para ácidos fenólicos, flavonoides e taninos condensados) e λ 340 nm (flavonoides). Os cromatogramas foram registrados e processados por LC Solution 1.25 por Shimadzu.

Tabela 4. Gradiente de eluição para análise por LC-MS da tintura de *Cocos nucifera*.

Tempo (minutos)	H ₂ O + 0,1% CH ₂ O ₂ (%)	ACN +0,1% CH ₂ O ₂ (%)
0,0	95	5
1,0	95	5
81,0	87	13
86,0	0	100
91,0	0	100
96,0	95	5
100,00	95	5

Nota: ACN = acetonitrila

A análise UPLC-UV-ESI-MSMS foi realizada no mesmo aparelho cromatográfico, acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massa com tempo quadrupolo (Q-TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O efluente da coluna foi introduzido no espectrômetro de massa a 0,25 mL/min. O gás nebulizador foi nitrogênio de alta pureza (N₂) produzido *online* por um gerador de nitrogênio Peak Scientific NM32LA. Os parâmetros de análise foram definidos usando o modo de ionização negativa com espectros adquirido em uma faixa de massa de m/z 50 a 1400.

Os parâmetros de análise foram definidos usando o modo de ionização negativa com espectros adquiridos em uma faixa de massa de m/z 50 a 1400. Os parâmetros ESI/MS ideais foram: voltagem capilar, +3,5 kV; temperatura do gás de secagem, 210 ° C; fluxo de gás de secagem, 10,0 L/min; pressão do gás de nebulização, 72,5 psi; RF de colisão, 200 Vpp; tempo de transferência 120 μ s; e armazenamento pré-pulso, 3 μ s. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão da seguinte forma: m/z 500, 30 eV; m/z 1000, 50 eV; m/z 1400, 70 eV; e usando N₂ como gás de colisão. Os dados de MS foram processados por meio do software Data Analysis 4.0. A calibração externa do instrumento foi realizada usando uma bomba de seringa Cole Palmer (Vernon Hills, IL, EUA) diretamente conectada à interface, eluindo um conjunto de solução de formato de sódio (NaCHO₂) contendo hidróxido de sódio 5 mM (NaOH) e 0,2% de ácido fórmico em água - isopropanol 1: 1 (v / v). O sistema LC / MS foi controlado pelo software HyStar 3.2 (Bruker Daltonics). O conjunto de dados foi adquirido, processado e analisado utilizando o *software* Bruker Compass DataAnalysis (versão 4.3) e posteriormente tabulados. A identificação das substâncias foi realizada utilizando os espectros de MS e MS/MS comparando com dados retirados da literatura (AITA *et al.*, 2021) e dados presentes em base de dados como *MassBank of North America* (HORAI *et al.*, 2010), *ReSpect for phytochemicals* (SAWADA *et al.*, 2012) e PubChem (Kim *et al.*, 2019).

4.12 Doseamento de taninos totais

Realizou-se o doseamento de taninos totais da TM de *Cocos nucifera* por espectrofotometria de absorção no UV-Vis de acordo com a monografia do Barbatimão presente na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). Os ensaios foram realizados em triplicata e todas as amostras foram protegidas da luz.

4.12.1 Preparo das soluções reagentes

4.12.1.1 Solução reagente de carbonato de sódio

Pesou-se cerca de 21,2 g de carbonato de sódio anidro e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL, completando o volume com água destilada.

4.12.1.2 Solução reagente fosfomolibdotúngstico

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foi adicionado 10 g de tungstato de sódio, 8 mL de ácido fosfórico, 2,5 g de molibdato de sódio, 10 g de ácido clorídrico e 75 mL de água ultrapura. O conteúdo foi mantido em refluxo por 3 horas. Após resfriamento, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada.

4.12.1.3 Preparo da solução amostra

Partindo da TM de *Cocos nucifera*, 10 mL foram transferidos para balão volumétrico, e em seguida, adicionados 50 mL de água destilada. A mistura (concentração = 16,67 mg/mL) foi filtrada utilizando papel de filtro e desprezando os primeiros 5 mL do filtrado (solução estoque).

4.12.1.4 Preparo da solução amostra para polifenóis totais

Uma alíquota de 5 mL da solução estoque foi transferida volumetricamente para balão volumétrico de 25 mL, que foi completado com água destilada e homogeneizado. Transferiu-se volumetricamente, 2 mL dessa solução com 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico SR, 10 mL de água destilada e o volume foi completado a 25 mL com solução de carbonato de sódio SR em balão volumétrico de 25 mL e homogeneizado. Exatamente após 30 minutos mediu-se a absorvância dessa solução em comprimento de onda 760 nm, utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.12.1.5 Preparo da solução amostra para polifenóis totais não adsorvidos pelo pó de pele

Foram adicionados 10 mL da solução estoque a 0,1 g do pó de pele e a mistura foi agitada mecanicamente por 60 minutos. A solução foi filtrada e 5 mL dela foi transferida volumetricamente para balão volumétrico de 25 mL e completado com água destilada e homogeneizado. Dessa solução, 2 mL foram transferidos volumetricamente para balão de 25 mL, adicionou-se 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico SR, 10 mL de água destilada e o volume foi completado a 25 mL com solução de carbonato de sódio SR. Exatamente após 30 minutos, a absorvância dessa solução foi medida em comprimento de onda 760 nm. Água destilada foi utilizada para ajuste do zero.

4.12.1.6 Preparo da solução referência

Dissolveu-se 50 mg de pirogalol em água destilada (100 mL). Dessa solução, 5 mL foram diluídos volumetricamente a 100 mL de água destilada e posteriormente transferiu-se desta solução 2 mL, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico SR, 10 mL de água destilada e o volume foi completado a 25 mL com solução de carbonato de sódio SR. Exatamente 30 minutos após a adição do último reagente, mediu-se a absorvância dessa solução em 760 nm. Água destilada foi utilizada para ajuste do zero.

O teor de taninos foi calculado utilizando a fórmula:

$$TT = \frac{(A_1 - A_2) \times m_2 \times 62,5}{A_3 \times m_1}$$

Em que TT= taninos totais, A1=absorvância medida da solução amostra para polifenóis totais, A2= absorvância medida da solução amostra para polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele, A3=absorvância medida da solução padrão, m₁=massa da droga vegetal considerando a determinação de água e m₂= massa pirogalol considerando a determinação de água e 62,5 é o fator de diluição.

4.13 Atividade sequestradora de radicais livres

A avaliação da atividade antioxidante da tintura de *Cocos nucifera* e derivadas centesimais e decimais foram avaliadas pelo ensaio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato (DPPH) de acordo com metodologia de Henriques et al. (2016). Para o preparo da solução, 1,20 mg de DPPH foi pesado e diluído com metanol em balão volumétrico de 10 mL, posteriormente protegida da luz. A solução de DPPH foi preparada no mesmo dia do uso.

4.13.1 Preparo da amostra da TM *Cocos nucifera*

Mediu-se 15 µL de TM e adicionou-se 1485 µL etanol, resultando em uma solução com concentração de 1000 µg/mL. A partir dela, seguiu-se com a diluição seriada da amostra, retirando 750 µL da solução de 1000 µg/mL e adicionando 750 µL de etanol, obtendo uma solução 500 µg/mL. Desta forma, obteve-se mais 12 soluções seriadas, identificadas como

solução 1, solução 2, solução 3, solução 4, solução 5, solução 6, solução 7, solução 8, solução 9, solução 10, solução 11 e solução 12.

4.13.2 Preparo da amostra das derivadas homeopáticas de *Cocos nucifera*

Utilizou-se as derivadas centesimais CH1, CH6, CH8, CH12 e CH30 e as decimais D1, D6, D8, D12 e D30. A partir de cada matriz, retirou-se a alíquota de 500 μL e adicionou-se 500 μL de etanol, seguindo-se com a diluição seriada, retirou-se a alíquota de 500 μL e adicionou-se 500 μL de etanol e assim sucessivamente até obter 5 diluições seriadas de cada matriz.

4.13.3 Preparo da solução de Rutina

Preparou-se uma solução de rutina, como controle positivo, em etanol 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 150 μL e adicionou-se 1350 μL etanol, resultando em uma solução com concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida iniciou-se a diluição seriada, retirando uma alíquota de 750 μL da solução anterior e adicionando-se 750 μL etanol, obtendo uma solução 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dessa forma obteve-se mais 5 soluções seriadas, identificadas como solução 1, solução 2, solução 3, solução 4 e solução 5.

4.13.4 Aplicação na placa

Para realizar o teste utilizou-se microplaca de 96 poços com fundo chato, transparente e com tampa. Nos poços A1-A3 até H1-H3 e A10-A12 até G10-G12 adicionou-se 140 μL de etanol. A amostra de *Cocos nucifera* TM e suas diluições seriadas foram aplicadas nos poços A4-A6 até G4-G6, do mais concentrado para o menos concentrado e de A7-A9 até G7-G9, aplicando-se 100 μL da amostra e 40 μL da solução de DPPH. Nos poços H4-H6 aplicou-se 100 μL de etanol e 40 μL da solução de DPPH para medida das absorvâncias branco. Incubou-se a placa a 37 °C durante 30 minutos e procedeu-se a leitura da absorvância em comprimento de onda 517 nm. O teste foi realizado em triplicata (Figura 3).

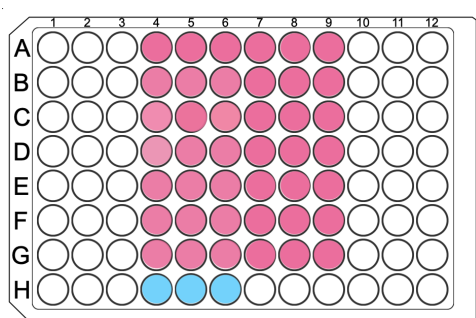


Figura 3. Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH na TM de *Cocos nucifera*. (Em branco foi aplicado apenas etanol; Rosa: amostra + 40 μ L da solução de DPPH; Azul: 100 μ L de etanol e 40 μ L da solução de DPPH)

A aplicação das derivadas homeopáticas foi realizada de duas formas: a primeira colocando as matrizes diretamente nos poços e a segunda realizando diluições seriadas (Figura 4). Ambos os testes foram realizados na microplaca de 96 poços com fundo chato, transparente e com tampa, em triplicata. Para o primeiro teste aplicou-se nos poços A1-A3 até H1-H3 e A10-A12 até G10-G12 140 μ L de etanol. Aliquotas de 100 μ L das matrizes derivadas centesimais CH1 a CH12, CH18 e CH30 foram aplicadas nos poços A4-A6 até G4-G6, do mais concentrado para o menos concentrado e de A7-A9 até G7-G9, e posteriormente adicionou-se 40 μ L da solução de DPPH. Nos poços H4-H6 aplicou-se 100 μ L de etanol e 40 μ L da solução de DPPH para medida das absorvâncias branco. Incubou-se a placa a 37 $^{\circ}$ C durante 30 minutos e procedeu-se a leitura da absorvância em comprimento de onda 517 nm. O mesmo procedimento foi realizado para avaliar as matrizes derivadas decimais D1 a D12, D18 e D30.

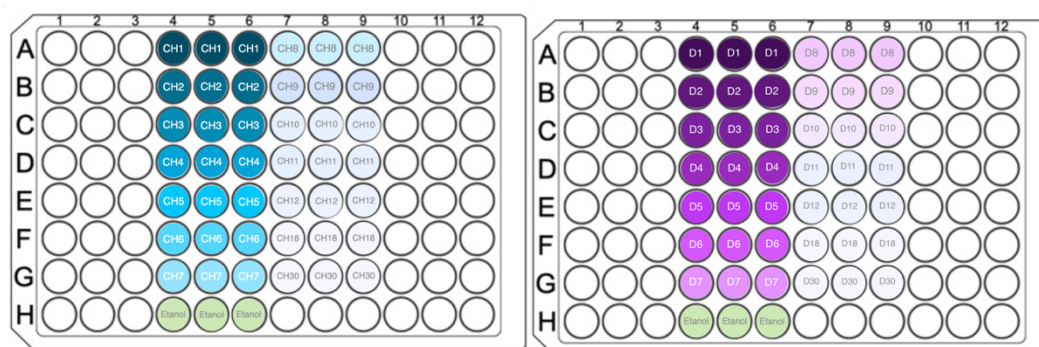


Figura 4. Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH das derivadas centesimais e decimais de *Cocos nucifera*. (Em branco foi aplicado apenas etanol; Azul: 100 μ L de amostras centesimais + 40 μ L da solução de DPPH / Roxo: 100 μ L de amostras decimais + 40 μ L da solução de DPPH Verde: 100 μ L de etanol e 40 μ L da solução de DPPH).

Para o teste com as diluições seriadas das matrizes foram aplicadas nos poços A1-A3 até H1-H3 140µL de etanol. A amostra e suas diluições seriadas foram aplicadas nos poços A4-A6 até G4-G6, do mais concentrado para o menos concentrado, aplicando-se 100 µL da amostra e 40 µL da solução de DPPH (Figura 5). Nos poços H4-H6 aplicou-se 100 µL de etanol e 40 µL da solução de DPPH para medida das absorvâncias do branco. Incubou-se a placa a 37 °C durante 30 minutos e procedeu-se a leitura das absorvâncias em comprimento de onda 517 nm.

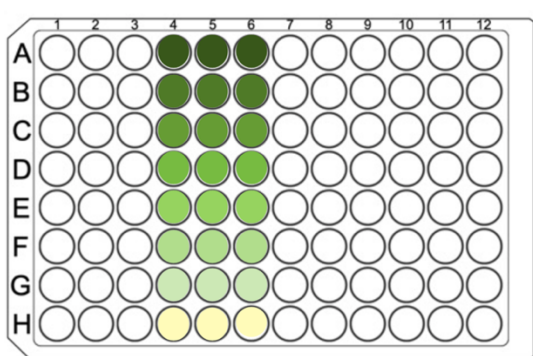


Figura 5. Esquema da placa de 96 furos para o teste de atividade sequestradora de radicais livres DPPH das derivadas centesimais e decimais de *Cocos nucifera* com diluição seriada. (Em branco foi aplicado apenas etanol; Verde: 100µL de amostras derivadas homeopáticas em diluição seriada ou rutina + 40µL da solução de DPPH; Amarelo: 100µL de etanol e 40µL da solução de DPPH).

Para o controle positivo, aplicou-se as soluções seriadas de rutina, realizou-se o teste na microplaca de 96 poços com fundo chato, transparente e com tampa, em triplicata. Nos poços A1-A3 até H1-H3 adicionou-se 140 µL de etanol. As amostras foram aplicadas nos poços A4-A6 até G4-G6, do mais concentrado para o menos concentrado, aplicando-se 100 µL da amostra e 40 µL da solução de DPPH. Nos poços H4-H6 aplicou-se 100 µL de etanol e 40 µL da solução de DPPH para medida das absorvâncias branco. Incubou-se a placa a 37 °C durante 30 minutos e procedeu-se a leitura da absorvância em comprimento de onda 517 nm.

O cálculo da atividade antioxidante (AAO) foi realizado segundo a fórmula:

$$AAO = \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} \times 100$$

Em que Abs₀ = absorvância do DPPH

Abs₁ = absorvância da amostra.

Plotou-se o gráfico da porcentagem de atividade antioxidante *versus* concentração da amostra no programa Microsoft Excel para a execução da regressão linear e cálculo da concentração que inibia em 50% a atividade (CI₅₀).

4.13.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 5.0. Os dados experimentais foram apresentados como média ± DP. A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar as diferenças significativas de cada amostra, seguida por pós-teste Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados diferentes quando $p < 0,05$.

4.14 Espectroscopia Ultravioleta (UV)

Foram realizadas leituras da TM de *Cocos nucifera* e derivadas centesimais e decimais utilizando o Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 e o software UV Probe. As amostras da TM de *Cocus nucifera* e as derivadas homeopáticas centesimais CH1, CH6, CH12 e as decimais D1, D6 e D12, foram preparadas conforme item 4.4, porém utilizou-se a solução hidroalcoólica a 5%(p/v) afim de evitar interferência do solvente na leitura. Para ajuste do zero utilizou-se solução hidroalcoólica 5%.

4.14.1 Obtenção dos Espectros de Absorção no UV

Os espectros foram adquiridos utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. A leitura foi feita na faixa de comprimento de onda de 200-400 nm.

4.15 Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Foram realizadas leituras da TM de *Cocos nucifera* e derivadas centesimais trituradas utilizando o Aparelho Perkin Elmer®, Specter One. Para tal, foram avaliadas amostras individuais da TM de *Cocos nucifera* e suas derivadas homeopáticas CH1, CH2, CH3 obtidas pelo método de trituração e lactose utilizado como insumo inerte. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 4000 - 400 cm⁻¹, por leitura direta.

4.15.1 Preparo da Amostra

Para preparo das derivadas centesimais trituradas de *Cocos nucifera* procedeu-se com a técnica de dinamização por trituração seguindo o método da Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3 ed.. Utilizou-se como ponto de partida a TM de *Cocos nucifera*, tendo sua força medicamentosa corrigida com posterior evaporação do solvente da tintura. Logo após o fechamento dos poros do gral com o primeiro 1/3 da lactose, adiciona-se a TM. Após evaporação, em temperatura inferior a 50 °C, seguiu-se com a técnica de trituração, conforme descrito a seguir:

1. A quantidade total de lactose a ser utilizada foi dividida em três partes iguais. Uma terça parte de lactose foi colocada em gral de porcelana e triturada para tapar os poros do mesmo.
2. Sobre esse terço de lactose, colocou-se a TM de *C. nucifera* (insumo ativo) a ser triturado obedecendo à escala centesimal (1 parte de insumo ativo para 99 partes de insumo inerte).
3. Homogeneizou-se com espátula de porcelana ou de aço inox e triturou-se vigorosamente durante 6 minutos.
5. O triturado aderido ao gral e ao pistilo foi raspado e homogeneizado com espátula de porcelana ou de aço inox, durante 4 minutos.
6. Procedeu-se a mais uma trituração vigorosa por 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
7. O triturado foi raspado durante 4 minutos.
8. A segunda terça parte de lactose foi adicionada.
9. Foi realizada nova trituração vigorosa durante 6 minutos.
10. O triturado foi raspado durante 4 minutos.
11. Procedeu-se a trituração vigorosa durante 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
12. O triturado foi raspado durante 4 minutos.
13. O último terço de lactose foi adicionado.
14. Procedeu-se a trituração vigorosa por 6 minutos.
15. O triturado foi raspado durante 4 minutos.
16. Procedeu-se novamente a trituração vigorosa por 6 minutos.
17. O triturado foi raspado durante 4 minutos.

18. Esse triturado foi acondicionado em recipiente bem fechado e protegido da luz, recebendo o respectivo nome homeopático e a designação de primeiro triturado (1 CH).

O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do segundo e terceiro triturado, porém utilizou-se no passo 2 o primeiro e segundo triturado (1CH e 2 CH), respectivamente.

4.16 Avaliação atividade anti-inflamatória e imunomodulara pela inibição de TNF- α

Com a finalidade de avaliar a atividade imunomoduladora da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas foi realizado estudos *in vitro* em cultura de células. Esta análise foi realizada em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira do Laboratório de Morfopatologia/Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.16.1 Avaliação da Citotoxicidade

A amostra *Cocos nucifera* TM foi solubilizada em meio RPMI contendo 2,0% de dimetil sulfóxido (DMSO) nas concentrações de (5,00 a 0,04 mg/mL). As derivadas homeopáticas, CH1, CH4, CH8, CH12 e D1, D3 e D9 produzidas em solução de glicerina a 5%, foram testadas apenas em suas concentrações atuais. O número de células foi ajustado para 5×10^5 por poço. As células foram adicionadas em placas de 96 poços e foram incubadas por 24 horas para adesão. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 μ L de meio RPMI e 100 μ L das amostras nas diferentes concentrações. Foram incluídos como controles células somente com RPMI, RPMI contendo DMSO 2,0% e RPMI contendo solução glicerinada, usada para o preparo das derivadas homeopáticas.

Após adição das amostras, as placas foram incubadas por 24h e 48h e foi determinada a viabilidade celular pelo método de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). O meio foi removido, os poços foram cuidadosamente lavados com meio RPMI e, em seguida, foi adicionado 100 μ L de RPMI sem vermelho de fenol contendo 10% de soro fetal bovino. Após a adição do meio, foram adicionados 50 μ L de MTT 2 mg/mL filtrado nos poços. Após esta etapa, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 4 horas. Depois deste tempo, a absorbância das amostras foi lida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 550 nm e a concentração citotóxica para 50% das células foi

determinada para a amostra *Cocos nucifera* TM, bem como a porcentagem de viabilidade celular para as derivadas homeopáticas.

4.16.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi avaliada em culturas de macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma®), contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina (60 µg/L). As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Para realização dos experimentos, após atingirem 80-90% de confluência, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com suporte plástico (*cell scraper*). Em seguida foram adicionados 10 mL de tampão PBS pH 7,2 acrescido de 1% de solução EDTA 200 mM. O PBS contendo as células foi então transferido para um tubo Falcon esterilizado e centrifugado a 370 xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado, meio RPMI foi adicionado para ressuspender as células e efetuou-se a contagem do número de células em câmara de NeuBauer.

As células (5 x 10⁵ células por poço) foram adicionadas em placas de 96 poços para cultivo celular e incubadas por 4 horas para adesão. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µL das amostras (*Cocos nucifera* TM em RPMI 0,5% DMSO nas concentrações de 0,25 e 0,1 mg/mL). Em seguida foram adicionados 100 µL de solução de lipopolissacarídeo (LPS) (5 µg/mL) com IFN-γ (100 ng/mL) em RPMI. Somente 200 µL de RPMI foram adicionados às células, para controle negativo, e 100 µL de RPMI mais 100 µL de LPS + IFN-γ para controle positivo. O experimento foi feito com quadruplicata em cada poço.

As placas foram incubadas por 48h e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 0,5 mL no gelo e estocados a -80 °C para dosagem de citocinas e óxido nítrico.

4.16.3 Dosagem de citocinas

A concentração de citocinas nos sobrenadantes coletados foi determinada por citometria de fluxo, utilizando o Kit CBA (*Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17*) (BD®), de acordo com as especificações do fabricante. Este método permite a quantificação simultânea das citocinas (interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-

10), Fator de Necrose Tumoral(TNF), Interferon-gama (INF γ) e interleucina 17A(IL-17A), empregando partículas (*beads*). Dessas foram mantidas a IL-6, IL-10 e TNF.

As amostras foram descongeladas em banho maria à 37 °C e centrifugadas por 10 minutos a 42916 g, 4 °C. Os padrões foram reconstituídos com 2,0 mL de Reagente G (dilúente) sendo, posteriormente, submetidos a uma diluição seriada de 1/2 até o limite de 1/256.

Seis populações de *beads* com intensidades de fluorescência distintas, revestidas com anticorpos de captura específicos para cada citocina analisada, são misturadas. A mistura (18 μ L) foi adicionada a tubos para citometria, juntamente com 25 μ L de amostras ou padrões e 18 μ L do fluorocromo PE.

Os tubos foram incubados 2h/temperatura ambiente, ao abrigo de luz e em seguida centrifugados e ressuspensos. A aquisição de dados foi feita em citômetro de fluxo (BD[®] FACSCalibur), 1800 eventos (300 para cada bead). Os resultados foram processados utilizando FCAP Software Array[™].

Os dados foram expressos como média da concentração absoluta de cada citocina. As análises estatísticas dos resultados das citocinas foram realizadas pelo teste paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism[®] 5.0. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato e derivadas homeopáticas:

Para se definir o teor alcoólico a ser utilizado no preparo da TM de *C. nucifera*, determinou-se o teor de resíduo sólido do mesocarpo fresco (Figura 6). A tabela 5 mostra o resultado da avaliação do resíduo seco do mesocarpo do coco fresco, que demonstra um teor de 20% de resíduo sólido. Como visto o mesocarpo do coco demonstra alto teor de água, sendo então preconizado pela Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição a utilização de álcool a 90% para o preparo de sua tintura-mãe.

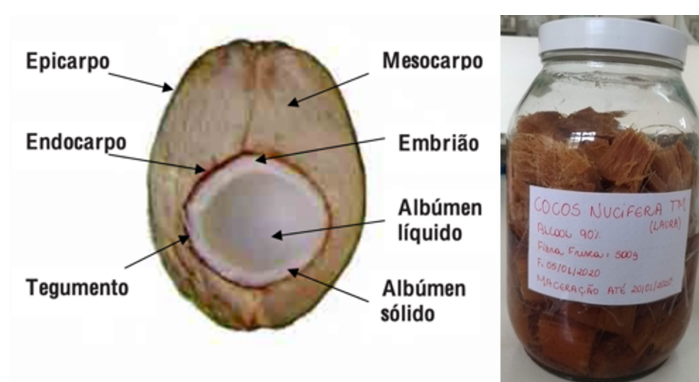


Figura 6. Estrutura de *Cocos nucifera* L. e a extração por maceração do mesocarpo fresco (BENASSI, 2006 e foto da autora)

Tabela 5. Determinação do resíduo sólido de vegetal fresco

Tempo (Min)	Peso total (g)	Resíduo sólido (%)
0	375	100
20	374	99,01
60	353	78,22
80	347	72,28
120	335	60,40
150	327	52,48
180	322	47,52
210	313	38,61
220	310	35,64
230	308	33,66
270	301	26,73
290	298	23,76
310	294	19,80
330	294	19,80

*Peso total da amostra + peso do recipiente

A partir da TM, prepararam-se as derivadas homeopáticas na escala centesimal de CH1 a CH30 e na escala decimal de DH1 a DH30, segundo método descrito na Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição, 2011.

5.2 Colorimetria

Para avaliação da cor da TM e das derivadas homeopáticas obtidas de *C. nucifera*, utilizou-se método espectrofotométrico com o sistema colorimétrico LAB, que realiza leitura dos parâmetros de luminosidade $-L$; e os termos numéricos A e B, que são as coordenadas cromáticas, sendo que A refere-se à coordenada vermelho/verde, onde (+) indica vermelho e (-) indica verde; e B refere-se à coordenada azul/amarelo, onde (+) indica amarelo e (-) indica azul. A figura 7, abaixo demonstra a identificação das cores por este método. A combinação dos três termos numéricos obtidos determina a cor de cada amostra.

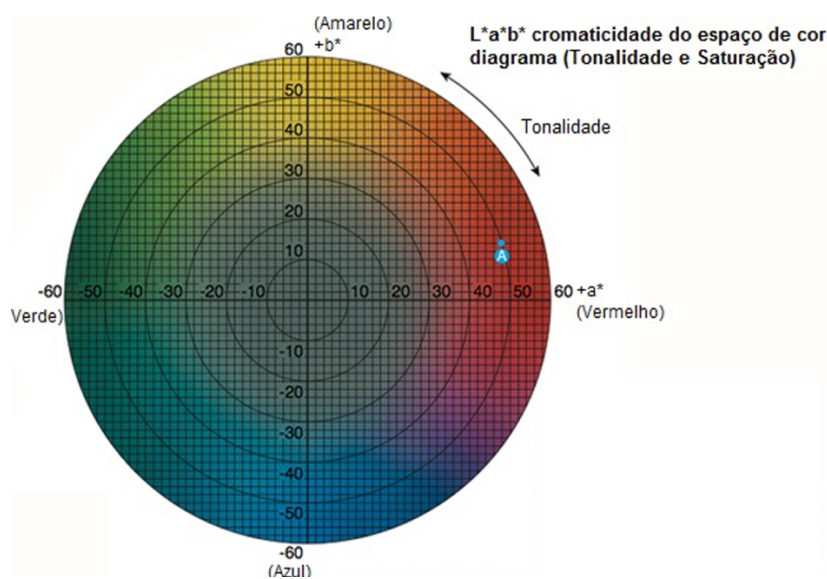


Figura 7. Identificação das Cores pelo método espectrofotométrico. (Fonte: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>)

A tabela 6 apresenta os valores numéricos encontrados no experimento para cada amostra e a figura 8 demonstra as amostras de TM de *C. nucifera* e suas derivadas homeopáticas em tubo de ensaio para teste de coloração. A leitura foi realizada em triplicata para cada amostra.

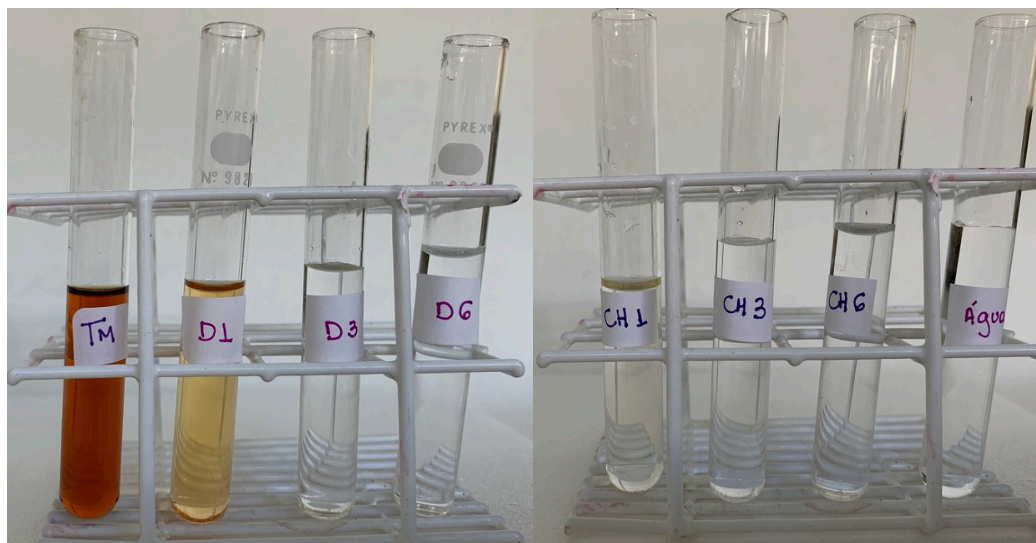


Figura 8. *Cocos nucifera*: TM e suas derivadas homeopáticas em anteparo branco.

Tabela 6. Análise colorimétrica por espectrofotometria da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas. Termos numéricos L A B de luminosidade e coordenadas cromáticas.

<i>Amostra</i>	<i>L</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>TM</i>	39,04	12,35	17,12
	38,92	11,52	16,4
	39,05	12,48	17,01
<i>Média:</i>	39,0033333	12,1166667	16,8433333
<i>D1</i>	50,85	-0,3	7,14
	50,64	-0,24	7,83
	51,23	-0,27	7,58
<i>Média:</i>	50,9066667	-0,27	7,5166667
<i>CH1</i>	54,65	-0,83	1,64
	53,52	-0,82	1,74
	53,65	-0,82	1,67
<i>Média:</i>	53,94	-0,8233333	1,6833333
<i>D3</i>	54,27	-0,93	0,08
	54,32	-0,95	0,16
	54,27	-0,92	0,17
<i>Média:</i>	54,2866667	-0,9333333	0,1366667
<i>CH3</i>	54,65	-0,97	0,03
	54,12	-0,95	0,11
	53,71	-0,93	0,12
<i>Média:</i>	54,16	-0,95	0,0866667
<i>D6</i>	52,57	-0,93	0,21

	51,81	-0,84	0,29
	51,69	-0,9	0,3
<i>Média:</i>	52,0233333	-0,89	0,26666667
<i>CH6</i>	53,72	-0,94	0,23
	53,27	-0,94	0,24
	52,79	-1	0,48
<i>Média:</i>	53,26	-0,96	0,31666667
<i>Água</i>	54,05	-0,92	0,07
	54,04	-0,98	0,07
	53,23	-0,9	0,05
<i>Média:</i>	53,7733333	-0,9333333	0,06333333

A luminosidade está relacionada com a opacidade/transparência, sendo que numa escala de 0 a 100, identifica-se se a cor é mais escura ou clara, preto a branco, de acordo com o método. Os termos numéricos encontrados para o parâmetro L, apresentados na tabela 6, mostrou que a TM de *Cocos nucifera* apresenta uma tonalidade mais escura do que as demais amostras, o que já era esperado, pois é a amostra mais concentrada, entretanto ainda permite a passagem de luz refletida, o que nos diz que se trata de uma amostra transparente. Estes valores de L intermediários observados nas amostras, portanto apresentam tom mais claro. Pode-se ainda constatar que todas as amostras das derivadas homeopáticas são transparentes; permitindo a passagem da luz refletida pelo espectrofotômetro e sendo comparável com a amostra de água.

Analisando os parâmetros A e B que se referem às escalas de cor, pode-se observar pelos resultados que a TM de *Cocos nucifera*, na escala A que varia do verde, é -120; ao vermelho +120; as amostras testadas apresentam valores positivos, em média de 12,11, podendo considerar uma cor avermelhada, mas não um extremo vermelho. No que se refere à escala de cor B, que varia do azul, negativo; ao amarelo, positivo, a média foi 17,01, confirmando presença de tons de amarelo, até mais fortes que o vermelho.

A amostra da derivada homeopática D1, apresenta uma claridade e transparência maior do que a TM, o que já era esperado para as matrizes de forma geral, pois já estão diluídas, entretanto, apesar do parâmetro A estar levemente negativo (-0,27), o parâmetro B apresenta-se positivo (7,52) indicando uma cor levemente amarelada. A mesma tendência de cor ocorre na derivada homeopática CH1, porém em maior intensidade, pois é ainda mais diluída do que a D1, entretanto a análise identifica um valor positivo no parâmetro B (1,68), indicando que é uma solução levemente amarelada. As demais amostras, D3 e D6, CH3 e CH6, revelam valores de

L, A e B equiparáveis aos valores de LAB da água, indicando que o processo de diluição levou a obtenção de soluções incolores e transparentes.

5.3 Densidade relativa

Foram realizadas três determinações de densidade relativa da TM de *C. nucifera* (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação de densidade relativa da TM de *Cocos nucifera*.

	<i>P</i> picnometro (g)	<i>P</i> picnometro água (g)	<i>P</i> picnometro amostra (g)	Densidade (g/mL)	Média densidade (g/mL)
1	25,999	50,507	48,538	0,91965	0,91939
2	25,999	50,492	48,503	0,91879	
3	26,001	50,506	48,539	0,91973	

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, (2019) o valor da densidade relativa deve ser corrigido para a temperatura ambiente (25 °C), dessa forma aplica-se a seguinte fórmula:

$$\rho = (0,99704 \times d^{20}) + 0,0012$$

O resultado final da densidade relativa da TM de *C. nucifera* foi de 0,917859 g/mL. A densidade relativa é um parâmetro farmacotécnico e não farmacopeico para produtos intermediários ou acabados, que não apresenta uma faixa limite definida nas monografias da Farmacopeia Homeopática Brasileira. Comparativamente, Fonseca et al. (2008), encontrou para a tintura de Barbatimão a densidade de 0,93, e Borella et al. (2012) encontrou para o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* a densidade de 0,9299 g/mL. Ambos resultados bem próximo do que foi encontrando para a tintura-mãe de *Cocos nucifera*.

5.4 Análise de pH

Foi realizada a análise do pH da TM de *C. nucifera*. Os valores de pH foram medidos em dispersão a 10% (v/v) da TM de *Cocos nucifera*, a fim de proporcionar uma diluição e melhor avaliação da concentração hidrogeniônica (pH aparente). A análise foi feita em triplicata e os resultados estão apresentados na tabela 8. O pH encontrado para a tintura foi de aproximadamente 5. Este valor de pH, situado na faixa ácida, pode ser explicado pela presença substâncias fenólicas característicos da tintura.

Tabela 8. Determinação de pH, em triplicata, da dispersão a 10% em água da TM de *Cocos nucifera*.

Amostra	1	2	3	Média
Valor	5,5	5,4	5,5	5,46

A Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011), não determina a faixa de pH para as tinturas-mãe em suas monografias. Fonseca et al. (2008) pesquisaram as características físico-químicas da tintura de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), uma planta medicinal rica em fenólicos e que tem como marcadores os taninos, e encontrou o valor de pH 4,8, valor se localiza na faixa ácida e próximo ao encontrado para a TM de *Cocos nucifera*, que também apresenta em sua constituição substâncias fenólicas. Para o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis*, rico em flavonoides, o pH foi de 5,80 (BORELLA *et al.*, 2012). Este resultado é diretamente influenciado pelos constituintes químicos presentes em cada espécie vegetal.

5.5 Determinação de resíduo seco da tintura mãe de *Cocos nucifera*.

A determinação do teste de resíduo seco é um parâmetro importante de qualidade de tinturas por expressar a quantidade de material não volátil extraído, incluindo os marcadores químicos e/ou grupos de substâncias responsáveis pela ação farmacológica do derivado vegetal. A análise do resíduo seco da TM de *C. nucifera* foi realizado em triplicata (Tabela 9).

Tabela 9. Resultado da determinação do resíduo seco da TM de *Cocos nucifera*.

Peso recipiente (g)	Peso Amostra (g)	Peso total (g)	Peso final (g)	Peso evaporado (g)	Amostra final (g):	%
62,3602	2,004	64,3642	62,3885	1,9757	0,0283	1,41
59,2968	2,007	61,3038	59,3383	1,9655	0,0415	2,06
54,3690	2,003	56,3720	54,4165	1,9555	0,0475	2,37
<i>Média = 1,95%</i>						

O resíduo seco da TM de *Cocos nucifera* foi de 1,95%, um resultado dentro do esperado para extratos vegetais. Comparativamente o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* apresentou um resíduo seco de 3,6% (BORELLA *et al.*, 2012). Com o resultado pode-se sugerir que a TM de *C. nucifera* apresenta um moderado teor de substâncias voláteis já que o valor de

resíduo seco se encontra em uma faixa mediana entre o valor encontrado e exigido para a maioria das tinturas mãe.

Na Farmacopeia Homeopática Brasileira (2011), está descrito o percentual de resíduo seco aceito para a tintura-mãe de algumas espécies vegetais, em suas respectivas monografias. O *Allium cepa*, por exemplo, tem determinação de resíduo seco igual ou superior a 2%. Para outras espécies como *Ruta graveolens*, *Gingko biloba* ou *Anacardium orientales*, é determinado o limite de resíduo seco igual ou superior a 1,5%. Já para a *Chamomilla*, *Belladonna* e *Hydrastis* o teor de resíduo seco é de 1,2% ou superior (BRASIL, 2011).

5.6 Análise em UV-vis da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas

As técnicas espectrofotométricas são fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas, o que depende tanto da concentração quanto de suas estruturas moleculares. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção molecular pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias. Na região do ultravioleta e visível, as transições são eletrônicas e ocorrem em porções da molécula chamadas de cromóforos. Estas transições compreendem promoção de elétrons de orbitais moleculares ocupados, geralmente, σ e π ligantes e n não ligantes, para os orbitais de energia imediatamente superiores, antiligantes π^* e σ^* (BRASIL, 2019).

Inicialmente foi realizado uma leitura no espectrofotômetro ultravioleta, compreendendo a faixa de λ 200-400nm. Na figura 9, observa-se que a TM de *Cocos nucifera* (cor verde), assim como a primeira dinamização decimal D1 (cor marrom), apresentam espectros de absorção no ultravioleta muito semelhantes com máximos de absorção em comprimento de onda de 210 e 300 nm. Já a primeira dinamização centesimal CH1 (roxa) apresenta uma curva diferenciada, com λ máximo em 210 e um pico na região de λ 280nm.

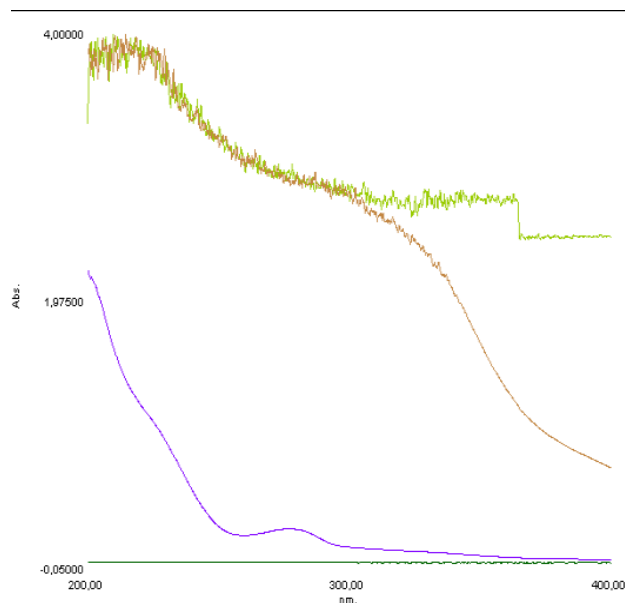


Figura 9. Espectro UV (λ 200 – 400nm) da tintura de *Cocos nucifera* (verde), e derivadas D1 (bege), CH1 (roxo) e solução de etanol a 5%, como branco (verde escuro).

A absorvância é uma propriedade intrínseca de cada substância e é medida por sua capacidade de absorver luz em um determinado comprimento de onda. Os taninos absorvem luz na região característica de comprimento de onda de 204–284 nm, sendo os anéis aromáticos os principais grupos cromóforos destas substâncias. Os elétrons conjugados em um anel aromático fornecem absorções características de intensidade moderada em cerca de λ 205 nm e uma banda menos intensa na faixa de λ 250–275 nm (GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016).

Já para a maioria dos flavonoides, cujos espectros de UV exibem pelo menos duas bandas de absorção, uma variando na faixa de λ 240 a 280 nm e outra na faixa de λ 300 a 400 nm. O comprimento de onda de absorção é afetado pela estrutura química, quando há um aumento no número e tipo de substituintes como, por exemplo, a presença de OH ou OCH₃ (ANOUAR; GIERSCHNER; DUROUX; TROUILLAS, 2012).

De acordo com estas informações pode-se concluir que a TM de *C. nucifera* é rica em compostos fenólicos, segundo a literatura científica ácido fenólicos, flavonoides e taninos. A TM foi analisada com o objetivo de se obter um perfil de absorção e compará-lo com as derivadas. A derivada homeopática D1, ainda é concentrada (diluição 1/10) em relação ao outras diluições e pode ser avaliada por este método, já que corresponde a 1 parte de insumo ativo (TM) diluído em 9 partes do insumo inerte (etanol 5%) (Figura 9). No caso da derivada

homeopática CH1, foi possível observar uma curva com menor absorvidade, com um pico na região de $\lambda_{\text{máx}}$ 280nm. A concentração desta dinamização corresponde a 1mg/100mL, uma concentração que se mostrou adequada para análise do espectro UV.

As demais potências D6 (azul), CH6 (cinza), D12 (marrom) e CH12 (roxo) apresentaram o mesmo perfil de espectro, reproduzindo a curva observada na derivada CH1. Os espectros UV podem ser observados na Figura 10.

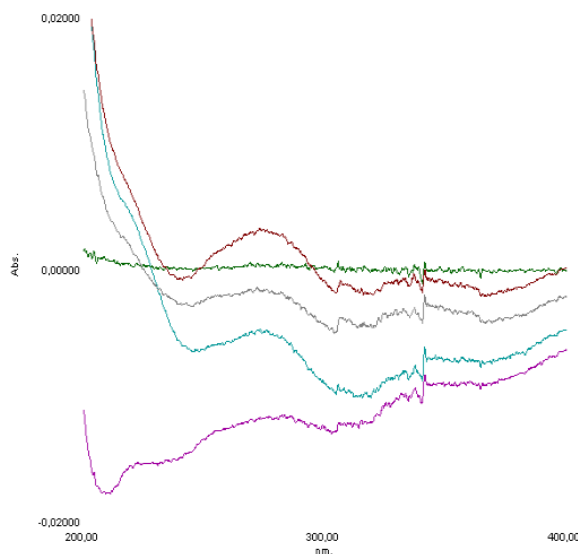


Figura 10. Espectros UV das derivadas homeopáticas D6 (azul), CH6 (cinza), D12 (marrom) e CH12 (roxo), de *Cocos nucifera*, álcool a 5% (verde).

Entretanto, uma evidência demonstrada no experimento é que as derivadas potencializadas homeopaticamente apresentaram o mesmo perfil espectral, mas uma absorvidade mais baixa em comparação ao controle, ou seja, a transmitância é maior nas derivadas homeopáticas do que no controle, com exceção de D12. Para desconto do solvente foi realizada a mesma análise utilizando a água como controle. É possível constatar espectros de absorção diferentes dos espectros das derivadas analisadas (Figuras 11 e 12). Sendo assim, é possível concluir que é possível o controle de qualidade qualitativo da tintura de *C. nucifera* e das derivadas C1 e D1. As demais derivadas demonstraram o mesmo perfil obtido para C1, porém com menor absorvidade, sendo difícil a diferenciação.

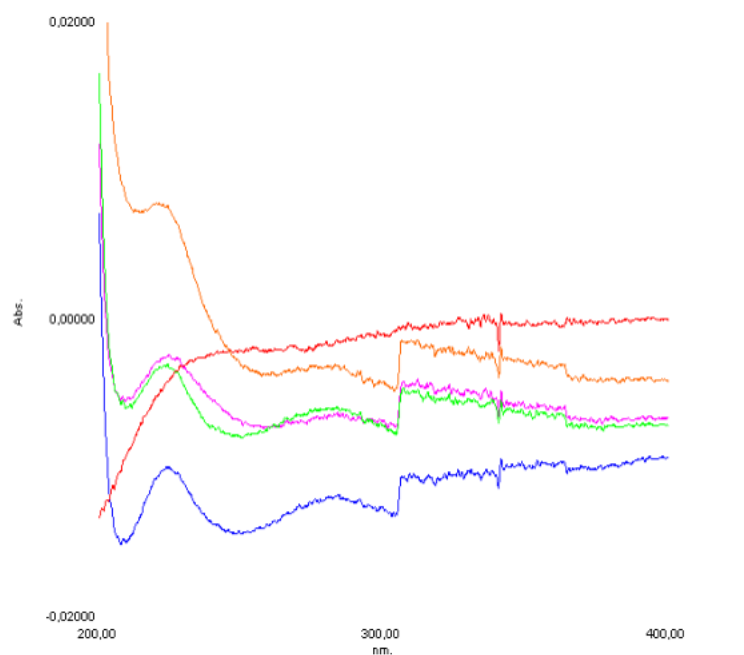


Figura 11. Espectros UV das derivadas homeopáticas CH6 (rosa), D6 (laranja); CH12 (azul); Verde: D12 (verde) de *Cocos nucifera* e água (vermelho).

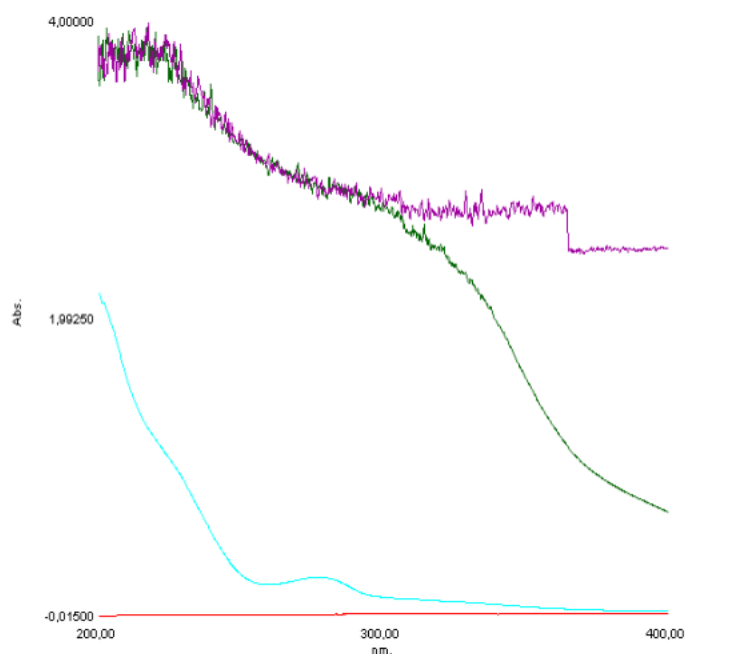


Figura 12. Espectro UV (λ 200 – 400nm) da TM de *Cocos nucifera* (roxo), e derivadas D1(verde), CH1 (azul) e água, como controle (vermelho).

Wolf *et al.*, (2011) encontraram resultados opostos ao analisarem derivadas homeopáticas a partir de minerais, a transmitância foi mais baixa quando comparada com o controle. O grupo desenvolveu a hipótese de que a transmissão mais baixa na espectroscopia UV corresponde a uma maior absorção de luz. A absorção na faixa de λ 160 e 200 nm corresponde a uma transição eletrônica entre os orbitais não-ligantes e antiligante ($n \rightarrow \sigma^*$) de elétrons não ligantes, n , no átomo de oxigênio da molécula de água. Os elétrons não ligantes envolvidos nesta transição são os mesmos elétrons que agem como aceptores de hidrogênio durante a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares. Assim, a absorção também depende da estrutura e temperatura da água, implicando em ligações de hidrogênio mais fracas, que levam, conseqüentemente, ao aumento da absorção de UV. Os valores de transmitância mais baixos indicam assim, que o diluente é menos estruturado ou mais dinâmico após o processo farmacotécnico homeopático de diluição e dinamização. Tal fenômeno pode ser causado por um estado de energia metaestável não térmica. Mas a possibilidade de estados metaestáveis em um líquido no contexto das teorias atuais da estrutura da água ainda precisa ser explorada.

5.7 Análise em Infravermelho da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas

A energia total da molécula é composta da energia derivada da vibração, da rotação e da energia eletrônica, gerada pela configuração de elétrons na molécula. Ao absorverem energia ocorre uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. Na região do infravermelho médio (MIR), ocorrem somente transições de energia vibracional por ser a radiação nesta região insuficientemente energéticamente para promover transições eletrônicas como na absorção pelo ultravioleta. As vibrações induzidas por radiação infravermelha compreendem estiramentos e tensionamentos de ligações inter-atômicas e modificações de ângulos de ligações. Já na região do infravermelho próximo (NIR) a absorção da radiação ocorre por sobretons e combinação de modos vibracionais fundamentais de ligações como C-H, N-H, O-H e S-H. As bandas de um espectro NIR, são, geralmente, mais fracas que as bandas do espectro MIR. A espectrofotometria NIR é amplamente utilizada para análises físicas e químicas, como quantificação e identificação de princípios ativos e excipientes, identificação de formas cristalinas e polimorfos, determinação do tamanho de partícula, padrão de desintegração e controle de processo (BRASIL, 2019).

Para se caracterizar a TM de *C. nucifera* e proceder a uma comparação com as derivadas centesimal foi obtido o espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 13). O espectro

infravermelho da TM de *C. nucifera* apresenta vários picos na região de 1500 a 500 cm^{-1} , um pico largo na região de 1600-1700 cm^{-1} ; um pico na região de 2900 cm^{-1} e uma banda larga entre 3000 – 3500 cm^{-1} . Essas regiões de intensidade de vibrações apresentam semelhança com o perfil de fenólicos, pois caracteristicamente *C. nucifera* tem em sua constituição ácidos fenólicos do tipo C6C1 e C6C3, como por exemplo o ácido 4-hidroxibenzóico e o ácido ferúlico, respectivamente, além de flavonoides. A banda na região de 3400 a 3000 cm^{-1} é referente ao estiramento de O-H associados em ligação de hidrogênio (PANTOJA-CASTRO, 2011). Na região de 2900 cm^{-1} , há a presença de bandas de estiramento simétrico e assimétrico de ligações C-H de alcanos de grupos CH, CH₂ e CH₃. Em aproximadamente 1685 cm^{-1} é possível observar banda larga de vibração de estiramento de C=O de cetonas α,β -insaturada em anel de 6 membros e de estiramento em 1700 cm^{-1} referente a C=O de ácidos carboxílicos alifáticos α,β -insaturado. Em 1340 cm^{-1} é possível observar bandas referentes a deformação de alcanos, C-H, em 1485 cm^{-1} de -CH₂- e 1470 cm^{-1} de -CH₃. Em aproximadamente 1200 cm^{-1} observa-se banda de deformação de ligação O-H e de estiramento de ligação C-O de fenóis em 1400 cm^{-1} . Em aproximadamente, 1000 cm^{-1} observa-se banda larga intensa de ligações de -C=C- de alceno em trans. Já na região de 700 a 880 cm^{-1} observa-se bandas característica de anéis aromáticos (JENSEN et al., 2008).

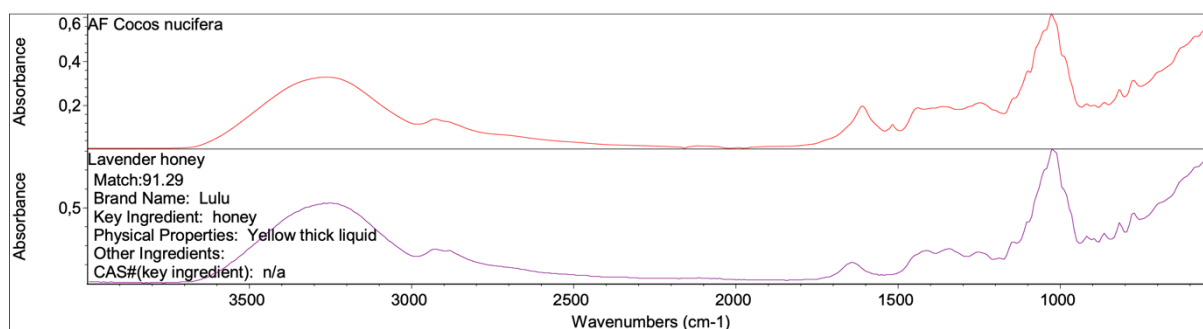


Figura 13. Espectro infravermelho da tintura de *Cocos nucifera*.

Para a produção das derivadas homeopáticas na forma farmacêutica sólida, utiliza-se o método da trituração, que é feito utilizando a lactose monoidratada como insumo inerte. Foram obtidas e analisadas as derivadas CH1, CH2 e CH3 (Figura 14) e seus respectivos controles, produzidos apenas com lactose. Nos espectros de infravermelhos obtidos para as derivadas homeopáticas, observa-se a grande semelhança aos espectros obtidos para os controles de cada um, ou seja, lactose monoidrata (Figura 15).

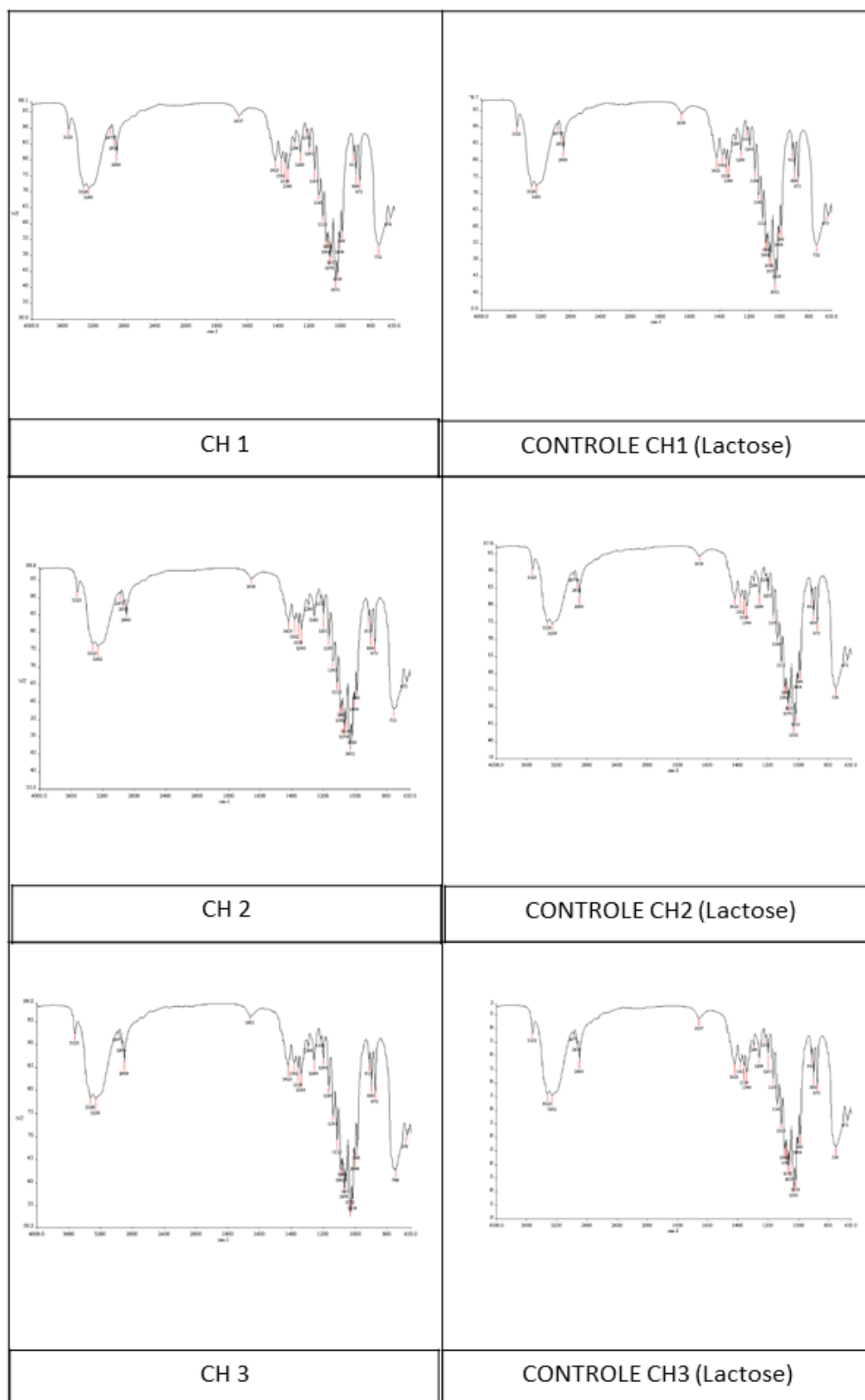


Figura 14. Espectros de transmitância na região do IV para as derivadas CH1, CH2 e CH3 de *Cocos nucifera* e dos respectivos controles em lactose.

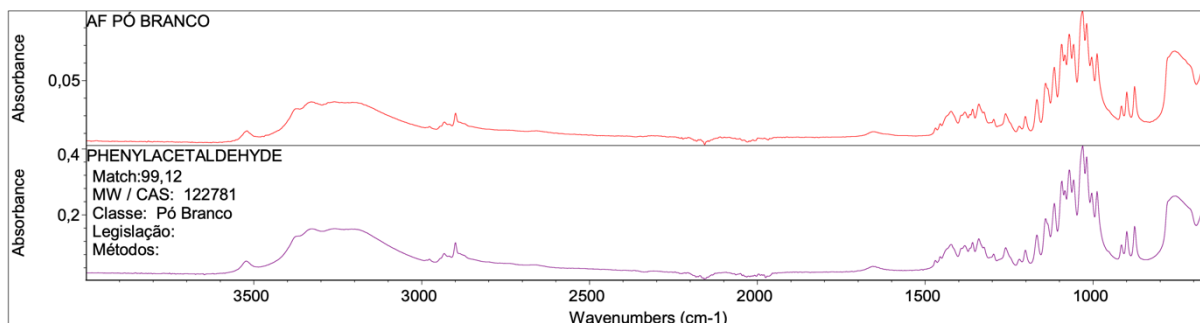


Figura 15. Espectro de infravermelho da lactose monohidratada.

A lactose monohidratada apresenta um espectro de infravermelho com os seguintes picos característicos: A banda observada de 3600 a 3200 cm^{-1} caracteriza as vibrações de estiramento de ligações C-O-H de grupos de álcool de lactose, que podem ser livres ou ligados. As duas bandas agudas de 3.000 a 2.800 cm^{-1} foram devido às vibrações de estiramento de dois tipos de ligações C-H: referentes à glicose e unidades de galactose e as do álcool metílico. A banda fraca em 1600 a 1700 cm^{-1} corresponde ao alongamento de vibrações de água da cristalização de ligações OH e de água adsorvida à superfície da lactose em análise. As bandas, observadas em 1500 a 1200 cm^{-1} , caracterizam as vibrações de deformação de ligações C-H. Todas as bandas que estão dentro de 1040 a 1160 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico das ligações da unidade de éter C-O-C (glicose e galactose). De 730 a 960 cm^{-1} vibrações de toda molécula de lactose, essas bandas são observadas em todos os açúcares (DRAPIER-BECHE; FANNI; PARMENTIER, 1999). Com estes resultados é possível concluir que a análise por infravermelho não é um bom método para o controle e análise de matrizes de derivadas homeopáticas, mas é um bom método para se obter uma impressão digital de extratos e tinturas vegetais, como é o caso da TM de *C. nucifera*, onde foi possível identificar as vibrações características das substâncias presentes. Sendo assim, podemos concluir que o espectro de IV da TM de *C. nucifera* pode trazer informações importantes sobre sua identidade e mais uma vez nos mostra sua constituição química rica em fenólicos. Em análise aos resultados obtidos para as derivadas em centesimal não é possível mostrar sua identidade a partir da TM nem diferenciá-las.

5.8 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Cromatografia de Camada Delgada é uma técnica amplamente utilizada, tanto para caracterização qualitativa como quantitativa. Este é um método de preparação manual. Possui a vantagem de ser econômico, simples e rápido (SIMÕES *et al.*, 2010). O sistema cromatográfico consiste em separar os componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma fase estacionária composta por uma fina camada de adsorvente. A fase móvel é constituída por diversas misturas de solventes e permanece no interior de um recipiente ou cuba de material transparente e inerte, permanecendo vedada, onde se deposita a cromatoplaça em posição vertical (BRASIL, 2019).

Para obter-se a impressão digital da TM de *C. nucifera* procedeu-se a análise qualitativa utilizando-se a cromatografia em camada delgada em gel de sílica. Inicialmente as cromatoplaças foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, pois o mesmo é um reagente universal para produtos naturais e possibilita a diferenciação de substâncias por cor (JORK, FUNK, *et al.*, 1990). Posteriormente, realizou-se a prospecção fitoquímica com reagentes seletivos para a identificação de flavonoides, taninos, terpenoides e esteroides, principais classes químicas descritas na literatura científica para a espécie. A figura 16 demonstra o perfil cromatográfico da TM de *C. nucifera* e padrões de referência característicos para a espécie. Em análise a cromatoplaça foi possível observar bandas com cor e fator de retenção (Rf) semelhantes aos das substâncias de referência: catequina, epicatequina e ácido clorogênico. As manchas de Rf geradas pelas substâncias de referência ácido cafeico e ácido ferrúlico são muito próximas, tornando difícil a avaliação da identidade na amostra por este método. Na tabela 10, estão expostos os valores encontrados de Rf da banda da TM de *C. nucifera* e dos padrões de referência.

O mesmo procedimento foi feito para a identificação de flavonoides e polifenóis, sendo utilizado como revelador o cloreto de alumínio 5% p/v e luz UV em λ 254nm. Na figura 17 podemos observar uma mancha azulada em Rf 3,7cm que não apresenta semelhança com as manchas das substâncias de referência utilizadas. Entretanto, observando a cromatoplaça na luz UV de λ 365 nm, é possível identificar algumas manchas com valores de Rf semelhante aos encontrados na TM de *C. nucifera* e os padrões de referência ácido clorogênico com Rf 1,6 cm e ácido cafeico com Rf 3,5 cm. No Rf de 4,5 cm é possível ver uma discreta banda que faz correspondência com as bandas de quercetina, apigenina e ácido cafeico embora não apresente a mesma intensidade. Sendo assim, não foi possível uma avaliação eficiente com esses padrões.

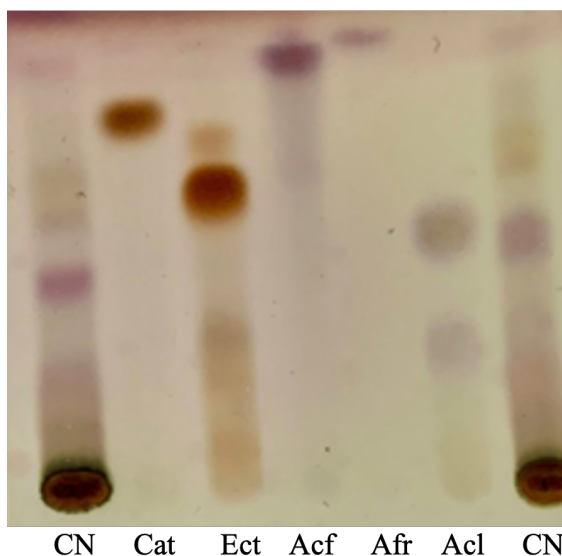


Figura 16. Cromatograma obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: anisaldeído sulfúrico. Padrões de referência (1mg/mL): cat=catequina; Ect=epicatequina, Acf=ácido caféico, Afr=ácido ferúlico e Acl=ácido clorogênico. Condições cromatográficas vide materiais e métodos.

Tabela 10. Valores de fator de retenção Rf encontrados na cromatoplaça da TM de *Cocos nucifera*. Revelador Anisaldeído sulfúrico. Padrões de referência: cat=catequina; Ect=epicatequina, Acf=ácido caféico, Afr=ácido ferúlico e Acl=ácido clorogênico.

Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
Amostra	Cat	Ect	Acf	Afr	Acl
4,5			4,5	4,6	
3,9	3,8	3,5			
3,3		3,0			3,1
2,1					
1,3					1,5

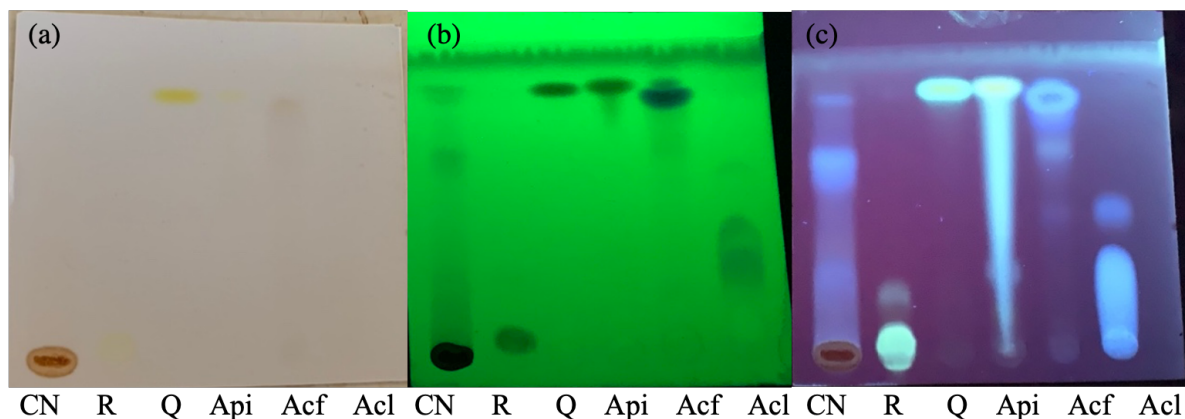


Figura 17. Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: Cloreto de alumínio 5%p/v. a) no visível; b) luz UV λ 254 nm; c) luz UV λ 365 nm. Padrões de referência (1mg/mL): R: Rutina; Q: Quercetina, Api: Apigenina, Acf=ácido cafeico e Acl=ácido clorogênico. Condições cromatográficas vide materiais e métodos.

Com o objetivo de se identificar polifenóis, como taninos utilizou-se, no mesmo método cromatográfico, o revelador o cloreto férrico 1%, seguido de lâmpada UV. A figura 18 representa os cromatogramas obtidos e neste é possível observar manchas tênues de substâncias dessa classe na amostra com esse revelador, mas é evidente o registro dos padrões de referência.

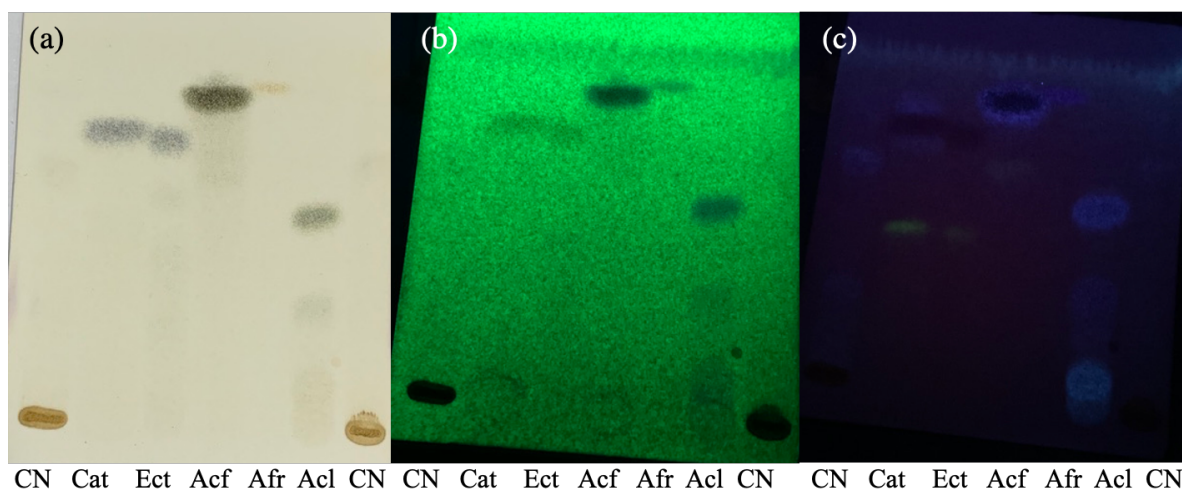


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica da TM de *Cocos nucifera* (CN) (70 mg/mL). Revelador: Cloreto Férrico. a) no visível; b) luz UV λ 254 nm; c) luz UV λ 365 nm. Padrões de referência (1mg/mL): cat=catequina; Ect=epicatequina, Acf=ácido caféico, Afr=ácido ferúlico e Acl=ácido clorogênico. Condições cromatográficas vide materiais e métodos.

Para a identificação de terpenos foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, entretanto o revelador utilizado foi o Lieberman-Burchard, seletivo para esta classe (Figura 19). No visível não foi possível observar reação colorimétrica.

A análise dos resultados da prospecção fitoquímica mostrou a presença de substâncias fenólicas, pela observação de bandas na cromatoplaças reveladas com cloreto de alumínio. Mas não foi possível demonstrar a presença de taninos, terpenos e esteroides nas cromatoplaças reveladas com cloreto férrico e Liebermam-Burchard, respectivamente.

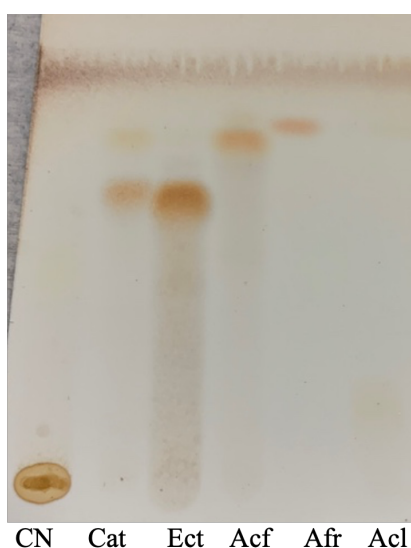


Figura 19. Cromatoplaça da TM de *Cocos nucifera* 70mg/mL (CN) em Camada Delgada de sílica gel. Revelador: Lieberman-Buchard e aquecimento. a) visível. Padrões de referência (1mg/mL): cat=catequina, Ect=epicatequina, Acf=ácido cafeico, Afr=ácido ferúlico e Acl=ácido clorogênico. Condições cromatográficas vide materiais e métodos.

Também foi possível sugerir a presença de catequina, epicatequina e ácido clorogênico com a utilização de padrões de referência. Esses resultados estão de acordo com a literatura científica, que apontam a presença de polifenóis como a catequina, epicatequina e ácido clorogênico no mesocarpo de *C. nucifera*, além de flavonoides, mas não mostram a presença de terpenos (LIMA et al., 2015; DEY et al., 2004, MENDONÇA-FILHO et al, 2003). É importante destacar que algumas drogas vegetais de frutos apresentam em sua constituição compostos fenólicos como os encontrados em *C. nucifera*. Como exemplo podemos citar a ameixa (*Prunus domestica* L.), cuja droga vegetal consiste de frutos secos contendo, no mínimo, 0,70% de ácido clorogênico. Outro exemplo é a *Citrus aurantium* L. (laranja amarga), cuja droga vegetal consiste de porções secas do exocarpo, possui em sua constituição o flavonoide naringina e o arilpropanoide ácido cafeico (BRASIL, 2019).

Com o objetivo de se avaliar o limite de detecção das derivadas homeopáticas nas escalas centesimal (CH1, CH3, CH6 e CH12) e decimal (D1, D3, D6 e D12), realizou-se, nas mesmas condições, as análises em CCD de sílica gel realizadas para a TM de *C. nucifera*. As derivadas homeopáticas passam pelo processo farmacotécnico de diluição e dinamização sucessivos, o que faz com que seja difícil, na maioria das vezes, identificar substâncias presentes na amostra por meio do método cromatográfico. Em análise aos cromatogramas obtidos com as derivadas homeopáticas nas duas escalas, reveladas com anisaldeídos sulfúrico, cloreto de alumínio, cloreto férrico e Lieberman-Burchard, como esperado não identificou bandas referentes às substâncias presentes no material do ponto de partida, ou seja, a TM de *C. nucifera*. Nas monografias da Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3 ed. (2011), observa-se análise qualitativa por CCD somente para TM que são os pontos de partidas para preparação das derivadas homeopáticas.

5.9 Doseamento de Taninos totais

A partir do levantamento bibliográfico e da prospecção fitoquímica da TM de *C. nucifera* foi possível confirmar a presença de fenóis, sendo assim, procedeu-se a quantificação de fenóis e taninos totais na amostra. A análise foi realizada por método espectrofotométrico utilizando o reagente fosfomolibdicotungstíco como agente colorimétrico. Este reagente promove a oxidação dos fenóis e mudança de cor na solução, sendo possível quantificar os taninos totais. O cálculo de teor de taninos é realizado indiretamente pelo uso de pó de pele que precipita os taninos e por subtração do teor de polifenóis totais, o teor da fração não tanante, isto é, o teor de polifenóis não reativos ao tratamento prévio com material proteico ou polimérico pode ser quantificado (SCALBERT, 1992). O pirogallol foi utilizado para o cálculo do teor de fenóis totais. O doseamento foi feito em triplicata e o valor do teor de taninos totais presente na TM de *C. nucifera* foi de 2,28%. Arivalagan e colaboradores (2018) determinaram o conteúdo de fenóis e flavonoide totais em extratos polares do endocarpo de *C. nucifera* e encontraram valores de 4,89 a 167 mg equivalente de ácido gálico (mg ácido gálico/g do material vegetal seco) e 12,4 a 78,1 mg equivalente de quercetina (mg quercetina/g do material vegetal seco), respectivamente. Estudo de Appaiah et al. (2014) demonstrou que o extrato metanólico a 80% da fibra do coco possui 1,9 mg equivalente de ácido gálico/ 100 g de material seco e em 2016 o mesmo autor demonstra um teor de 1,3 g de ácido gálico/ 100 g de material seco para o extrato

etanólico (APPAIAH, SUNIL, KRISHNA, SURESH KUMAR, 2016). Esses resultados confirmam a abundância de fenóis no mesocarpo de *C. nucifera*.

5.10 Análise da TM de *Cocos nucifera* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A utilização de CLAE acoplada a detectores UV-DAD oferece uma maior confiabilidade na identificação da constituição química, pois é possível confirmar as características espectrofotométricas dos picos de interesse observados nos cromatogramas. Na ausência de substâncias químicas de referência, a técnica oferece informações espectrais importantes sobre os componentes químicos presentes em matrizes complexas, por meio do registro de espectros para cada pico do cromatograma (MIGUES, 2018).

Lima et al., (2015) em seu trabalho de revisão descreve estudos fitoquímicos de extratos alcoólicos da fibra de coco e mostram a presença de carboidratos complexos, fenóis, taninos, leucoantocianidinas, flavonoides, triterpenos, esteroides e alcaloides. Alguns trabalhos descrevem a presença, principalmente, de ácidos fenólicos do tipo C6C3 e C6C1, flavonoides, dentre eles, flavan-3-ol, compostos que são monômeros de taninos, além de cumarina (OLIVEIRA et al., 2021; ARIVALAGAN et al. 2018; VALADEZ-CARMONA et al. 2016; DEY et al. 2003).

Após a análise por CCD de sílica gel confirmou-se a presença de fenólicos, em sequência foi realizada a análise por CLAE-DAD da tintura de *C. nucifera* com o objetivo de se obter o perfil fitoquímico e ampliar a identificação qualitativa. A figura 20 representa o cromatograma obtido por CLAE-DAD. No cromatograma é possível observar a predominância de compostos polares com picos entre 0 a 30 minutos. Em análise aos espectros de ultravioleta de picos majoritários do cromatograma é possível identificar a presença de fenóis com cromóforos representativos de esqueletos do tipo C6C3, picos em tempo de retenção (TR) em 11,87, 14,20 e 16,09 min, C6C3, picos em TR de 12,87 e 16,66 min e C6C1, picos em TR de 18,21 min (ARIVALAGAN et al. 2018).

Substâncias de referência também foram avaliadas por CLAE, utilizando as mesmas condições cromatográficas usadas na análise da tintura de *C. nucifera*. Essa etapa visou à identificação dessas substâncias de referência na tintura por meio da comparação do tempo de retenção e perfil de absorção. As substâncias de referência utilizadas foram ácido gálico, vanilina, ácido

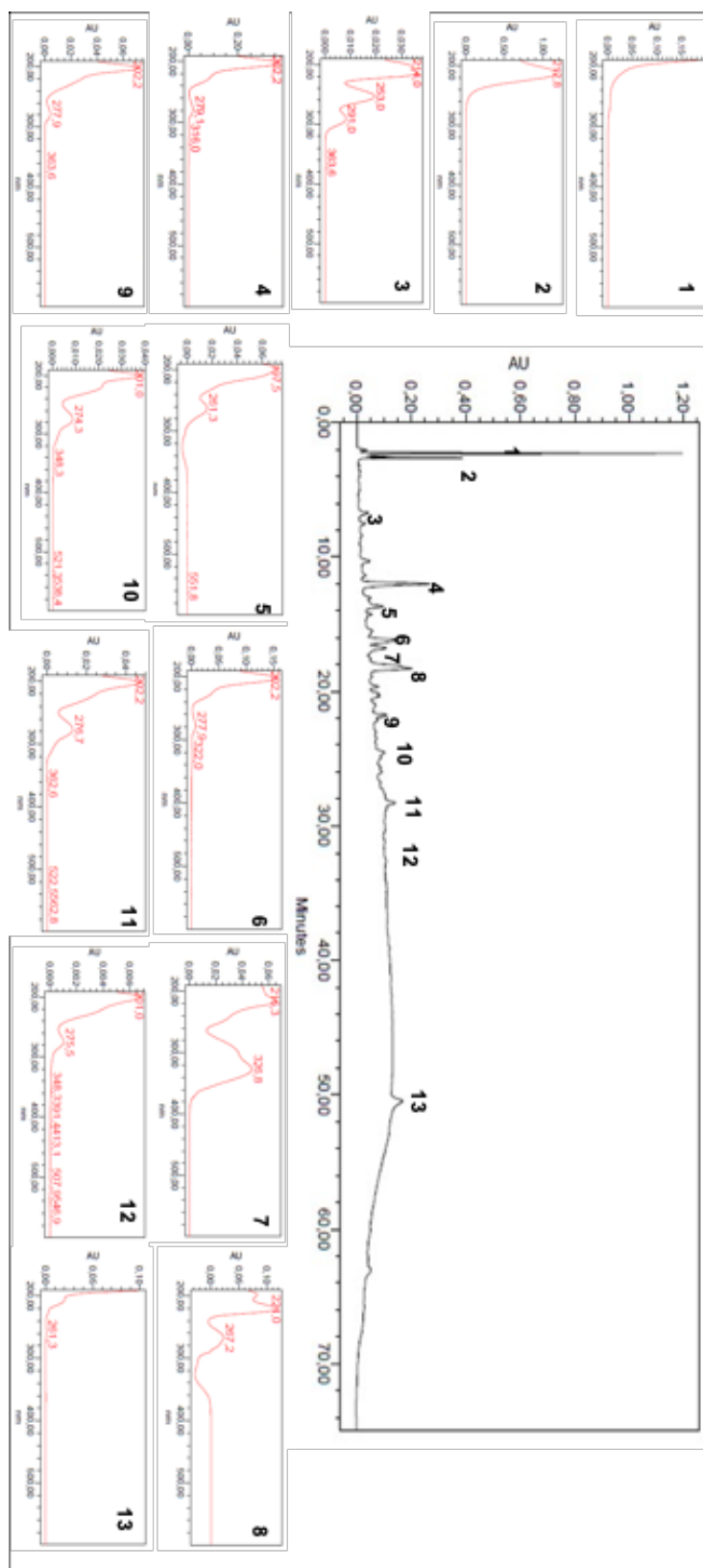


Figura 20. Cromatograma da TM de *Cocos nucifera* e espectros de ultravioleta de alguns picos majoritários, λ 210 nm. Condições cromatográficas vide material e métodos. A: Catequina; B: Epicatequina; C: Ácido clorogênico.

caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, procianidina B2 e A2, apigenina, quercetina e rutina. A escolha foi feita de acordo com a disponibilidade de padrões no laboratório e com base no levantamento bibliográfico da química micromolecular de *C. nucifera*. Em análise aos cromatogramas das substâncias de referência fez-se a seleção das substâncias para os experimentos de coinjeção com o ácido clorogênico, catequina, epicatequina e epigallocatequina. As figuras 21 e 22 representam os cromatogramas de alguns padrões e coinjeções realizadas.

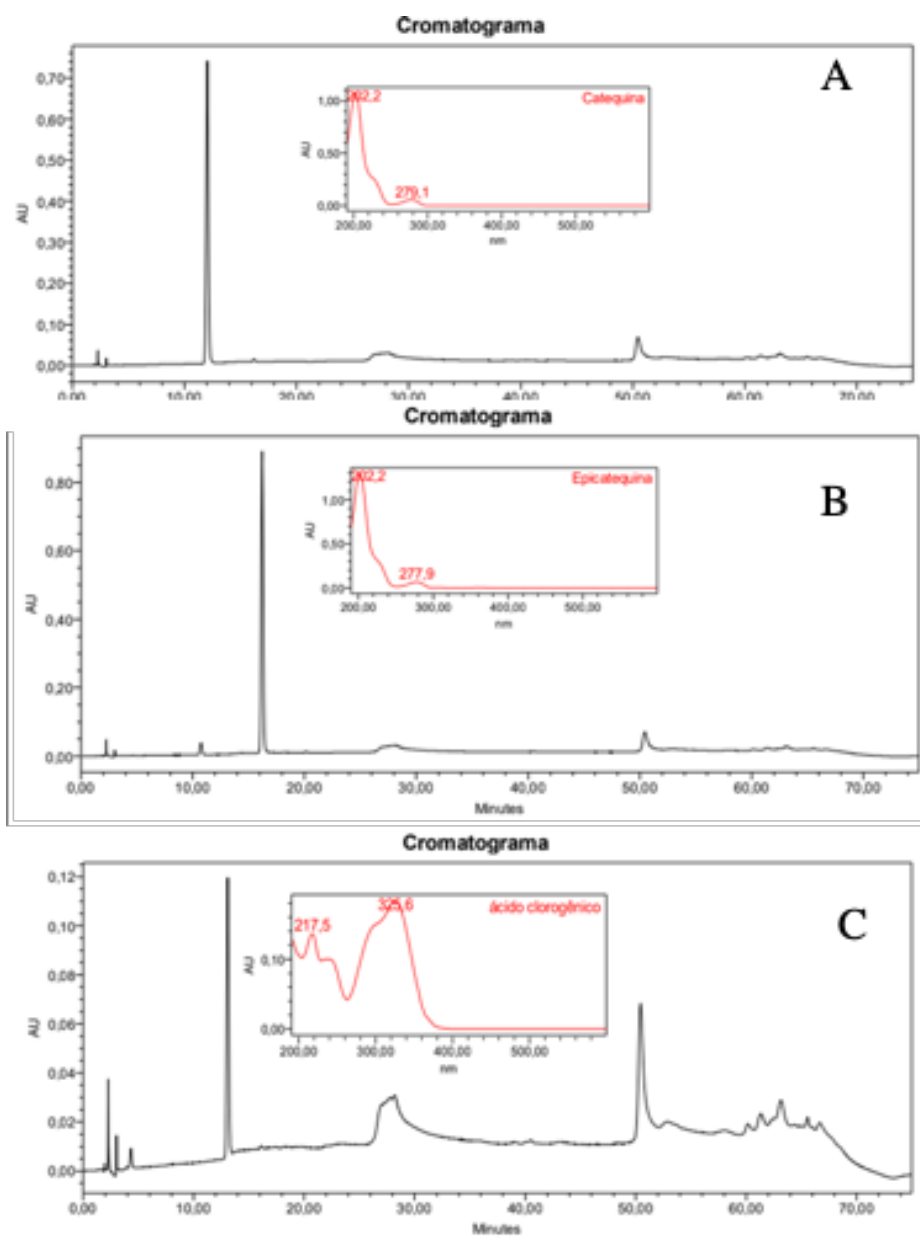


Figura 21. Cromatogramas das substâncias de referência: a) catequina TR:12,021s, b) epicatequina TR:16,216s, c) ácido clorogênico, TR: 13,071s. λ 210 nm. Condições cromatográfica de Nascimento et al., 2013.

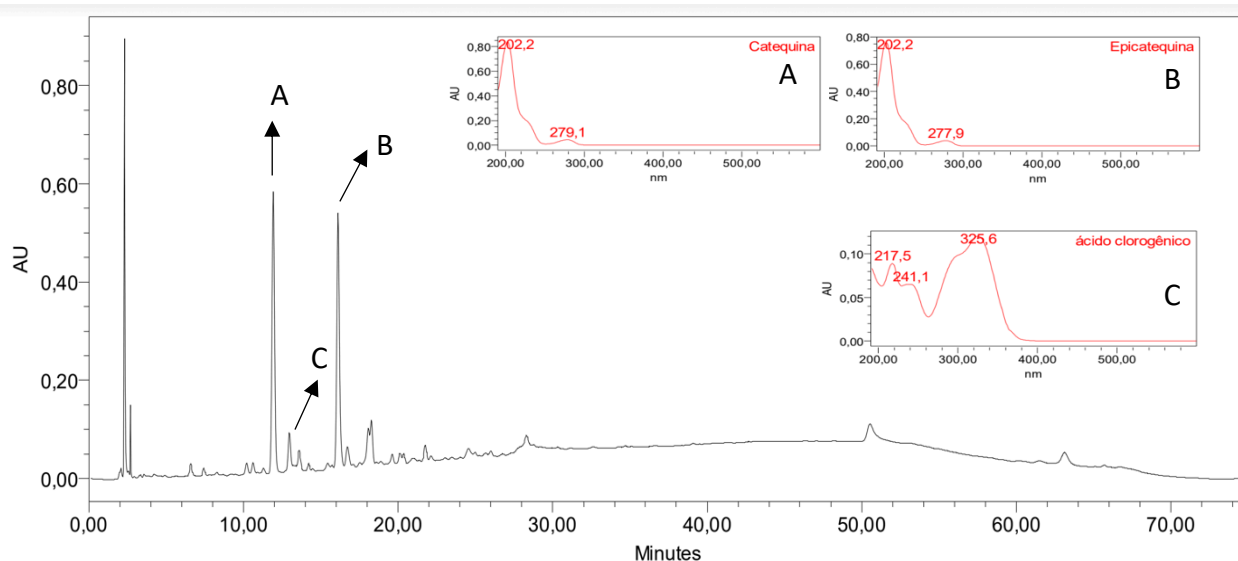


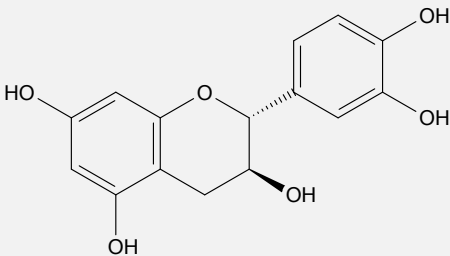
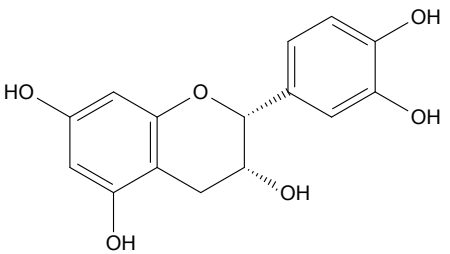
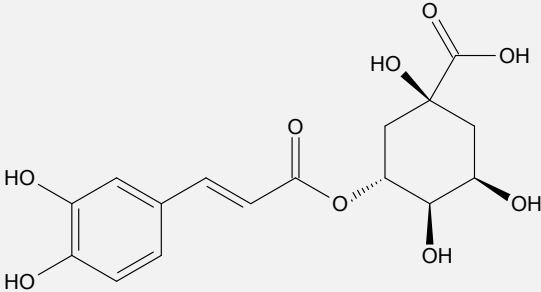
Figura 22. Cromatograma obtido por CLAE- DAD para a coinjeção da tintura de *Cocos nucifera* e dos padrões catequina, epicatequina e ácido clorogênico. Condições cromatográficas de Nascimento et al., 2013.

Como é possível constatar foi realizada a confirmação da presença, por coinjeção, do ácido clorogênico, catequina e epicatequina (Tabela 11) (ARIVALAGAN et al. 2018, Oliveira et al., 2021). Os resultados encontrados corroboram com os apresentados recentemente por Oliveira et al. (2021) e Arivalagan et al. (2018), que em seu trabalho demonstraram a presença dos compostos fenólicos ácido clorogênico, catequina e epicatequina, entre outras substâncias.

5.11 Análise da TM de *Cocos nucifera* por cromatografia líquida de alta eficiência espectroscopia de massas (UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS)

A identificação de compostos fenólicos é uma questão crítica no campo de pesquisa da análise fitoquímica. Os compostos fenólicos são uma classe estruturalmente diversa de compostos, abrangendo uma ampla gama de pesos moleculares, propriedades ácido-básicas e complexidade de estrutura. Flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos estão frequentemente presentes como glicoconjugados em açúcares ou derivados de açúcar e/ou acilados em ácidos alifáticos e aromáticos. (AITA et al., 2021).

Tabela 11. Valores de tempo de retenção para substâncias identificadas na TM de *Cocos nucifera* por co-injeção com padrões de referência por CLAE-DAD.

Substância	TR	$\lambda_{\text{máx.}}$	Estrutura química
Catequina	12,05	279,1	
Epicatequina	16,196	277,9	
Ácido clorogênico	13,059	217,5/239,9/ 325,6	

A análise da TM de *C. nucifera* por CCD e HPLC-DAD confirmou a presença de substâncias fenólicas em sua composição. Essa classe de substância é importante por possuírem atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomodulatória de interesse para o presente estudo (OLIVEIRA et al., 2021; CLARKE; MULLIN, 2008; RINALDI, 2009). Assim, com o objetivo de analisar qualitativamente a TM de *C. nucifera* foi realizada análise em cromatógrafo a líquido acoplado a detector de massa com ionização por *electrospray* (Figura 23). Foi selecionado o comprimento de onda de 210 nm para aquisição do cromatograma e, todos os sinais correspondentes aos picos cromatográficos foram extraídos os íons moleculares e fragmentos MS2 do cromatograma do pico base (BPC). A tabela 12 apresenta os compostos desreplcados, bem como tempo de retenção TR (min), fórmula molecular, m/z [M-H] e

principais fragmentos m/z (abundância relativa). Os espectros de massas obtidos para os picos da tintura de *C. nucifera* estão dispostos no anexo I.

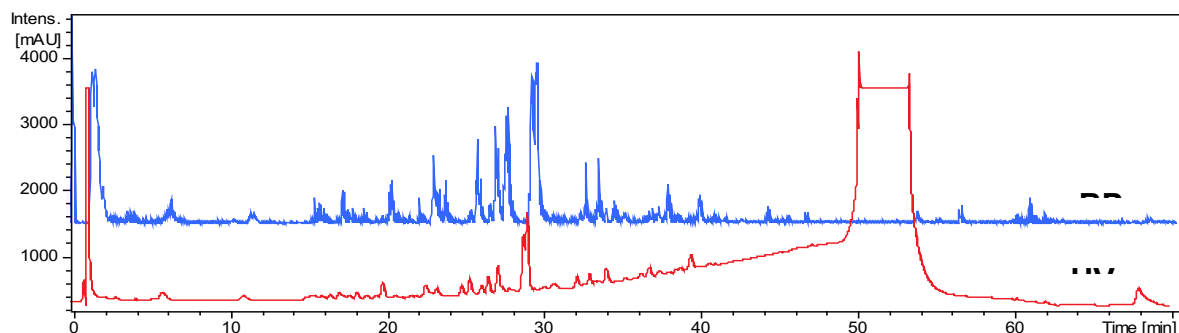
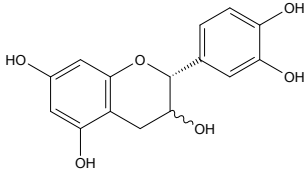
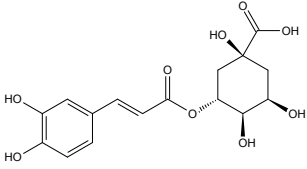
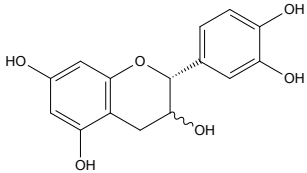
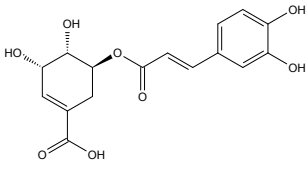
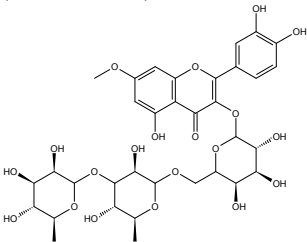


Figura 23. Cromatogramas da tintura de *C. nucifera* obtidos no UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Cromatograma de pico base (BPC – *base peak chromatogram*) B. Cromatograma observado em λ 210 nm C. Condições cromatográfica vide material e métodos.

Tabela 12. Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desrepliação da tintura de *Cocos nucifera* por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS.

Composto	TR (min)	Nomenclatura proposta (Fórmula molecular)	UVmax (nm)	m/z [M-H] ⁻	Principais fragmentos m/z (abundância relativa)	Referência
1	6.4	N.I.	255	345.0825	268.8678(21); 137.0242(100)	-
2	11.6	Ácido hidroxibenzóico	254	137.0251		Horai <i>et al.</i> , 2010.
3	15.8	N.I.	253	329.0880	167.0332 (43.3); 152.0204 (100); 123.0453 (29.1)	-
4	15.8	N.I.	253	375.0943	167.0366(100); 152.0127(36); 126.7162(33); 123.0421(19)	-
5	17.5	N.I.	280	443.1761	403.8400(23); 397.1700(25); 251.1103(100); 211.1796(16); 161.0446(28.7); 143.0328(8)	-
6	18.6	N.I.	260	359.0981	197.0491(19.4); 182.0207(55); 157.2166(35); 153.0496(28); 138.0282(100); 123.0067(18)	-
7	19.8	N.I.	278	293.1295	131.0827	-

8	20.3	Catequina/Epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	278	289.0692	289.0692(100); 245.0822(15); 137.0275(10); 112.5951(24)	Aita <i>et al.</i> , 2021.
						
9	22.2	N.I.	279	493.1558	293.0864(66); 238.6431(36); 233.071(100); 191.0547(30); 158.7876(15); 125.0250(50)	-
10	23.1	Ácido clorogénico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)	324	353.0868	202.4643 (3.6); 191.0566 (100); 181.0244 (2.7)	Horai <i>et al.</i> , 2010.
						
11	23.9	N.I.	268	357.1199	342.0915 (3.8); 181.5137 (33.2); 177.0566 (64.4); 167.6807 (31.5); 162.0319 (100);	-
12	25.9	Derivado ácido cafeoilquímico	269	597.1920	597.1920(100); 553.2011(24); 482.1673(28); 335.1258(10); 292.1175(9); 247.0810(3); 173.0728(21); 132.0317(14);	Aita <i>et al.</i> , 2021.
13	26.7	Catequina/Epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	278	289.0711		Aita <i>et al.</i> , 2021.
						
14	27.1	Ácido cafeoilquímico (C ₁₆ H ₁₅ O ₈)	325	335.0763	179.0336 (9.6); 161.0242 (100); 135.0450 (16.9); 133.0292 (23.5)	Aita <i>et al.</i> , 2021.
						
15	27.1	Cyanidina <i>O</i> -hexoside / Myricetina <i>O</i> -pentoside		449.4669	292.6808(100); 269.0434(90); 259.0581(95);	Aita <i>et al.</i> , 2021.

16	27.8	Ácido cafeoilchiquimico (C ₁₆ H ₁₅ O ₈)	326	335.0762	183.8319(33); 155.2006(44) 179.0352 (53.6); 161.0253 (8.4); 135.0452 (100)	Aita <i>et al.</i> , 2021.	
17	29.3	Ácido cafeoilchiquimico (C ₁₆ H ₁₅ O ₈)	325	335.0764	179.0343(50.2); 161.0244 (30.8); 135.0452 (100)	Aita <i>et al.</i> , 2021.	
18	29.7	N.I.	271	482.1612	438.1721(6); 336.1021(7); 292.1166(100); 247.0816(11); 200.0709(18); 161.0438(9); 130.0669(63)	-	
19	32.7	N.I.	269	537.1936	327.1210 (100); 195.0668 (28.3); 165.0556 (37)	-	
20	33.5	N.I.	278	537.1940	327.1194(30); 195.0584(100); 165.0481(96)	-	
21	38	Xanthorhamnina (7- metilquercetina-3- galactosido-6"-rhamnoside- 3'''-rhamnoside) (C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀)	260	769.2153	613.5476 (5.4); 314.0427 (100);	Horai <i>et al.</i> , 2010.	
							
22	40.1	Derivado do ácido cafeoilchiquimico	277	491.1911	388.5232(24); 335.1595(65); 329.1317(67); 307.1007(21); 247.4502(100); 243.5312(84); 175.0809(26)	-	
23	40.1	N.I.	277	566.1911	503.1762(54); 491.1890(100); 309.1124(33); 179.0598(12)	-	

A análise dos espectros de UV, obtidos previamente com a análise por CLAE-DAD, permitiu sugerir a presença de flavanois no tempo de retenção de 11,9 minutos ($UV_{\text{máx}}$ 279,1) e ácidos fenólicos ou derivados em 16,7 minutos ($UV_{\text{máx}}$ 326,8nm). Estas classes de compostos foram identificadas com auxílio dos espectros de massa, em um total de nove substâncias.

Entre os metabólitos da classe dos flavanóis, foi possível sugerir a presença de dois sinais correspondentes a catequina/epicatequina ($C_{16}H_{15}O_8$) $[M-H]^-$ m/z 289.0692 e m/z 289.0711 (massa exata: 290.0790; $UV_{máx}$ 278nm). A busca em base de dados de livre acesso (GNPS, MoNA, PubChem, ReSpect) e dados encontrados na literatura (OLIVEIRA et al. 2021, ARIVALAGAN et al. 2018) também possibilitaram a identificação de um flavonol, denominado xanthorhamnina de massa $[M-H]^-$ m/z 769.2173 ($C_{34}H_{42}O_{20}$; massa exata: 770.2269), glicosídeo da ramnetina, flavonol metoxilado. Considerando os ácidos fenólicos, foram encontrados 5 derivados do ácido caféico, com massa e perfil de fragmentação correspondente aos ácidos cafeoilchiquímicos, com os íons desprotonados $[M-H]^-$ m/z 335.0763, m/z 335.0762 e m/z 335.0764 ($C_{16}H_{15}O_8$; massa exata: 336.0845; $UV_{máx}$. 325/326nm). Segundo Cunha (2019) este conjunto de substâncias foi encontrado em amostras de água de coco, porém sem demonstrar a diferenciação entre os isômeros. Neste momento, a diferenciação dos isômeros não pôde ser concluída, apesar de ser evidente a abundância dos fragmentos presentes, demonstrada no trabalho de Fang *et al.* (2002). Além destes três isômeros de cafeoilchiquímicos, também estão presentes mais dois derivados cafeoilchiquímicos de massa $[M-H]^-$ m/z 597.1920 e m/z 491.1911, que não foram identificados. Por fim, o ácido clorogênico foi identificado, com o conjunto de dados, apresentando massa $[M-H]^-$ m/z 353.0868 ($C_{16}H_{18}O_9$; massa exata 354.0950; $UV_{máx}$. 324nm).

Os vários isômeros do ácido clorogênico são ésteres formados entre o ácido quínico e um ou mais derivados do ácido hidroxicinâmico, mais comumente caféico, p-cumárico e ferúlico (LIANG; KITTS, 2015). De acordo com a identidade, o número e a posição dos resíduos de grupo acila, é possível distingui-los. Podem ser formados por monoésteres de ácido caféico, p-cumárico e ferúlico: ácidos cafeoilquínico, ácidos p-coumaroilquínicos e ácidos feruloilquínicos, respectivamente. É também possível à formação de diésteres, triésteres e o único tetraéster do ácido cafeico. Ainda pode-se encontrar a formação de diésteres mistos de ácido caféico e ferúlico ou ácido caféico e sinápico: ácidos cafeoilferuloilquínico e ácidos cafeoilsinapoilquínico. E por último, há a formação de ésteres mistos envolvendo várias permutações de um ou três resíduos de ácido caféico com um ou dois resíduos de ácido alifático dibásico, por ex. glutárico, oxálico e succínico (WIANOWSKA; GIL, 2018).

O ácido clorogênico (CGAs) é um dos compostos de ácido fenólico mais presentes em alimentos, como café e chás. O termo CGA significa todo o conjunto de ésteres hidroxilcinâmicos juntamente com ácido quínico, incluindo ácidos coumaroilquínicos, feruloil-, cafeoil- e dicafeoil- (NAVEED et al., 2018). São descritas muitas atividades biológicas, como

atividades hepatoprotetora e colerética, propriedades antioxidantes, antivirais, antibacterianas, anticâncer e anti-inflamatórias, modulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes, redução do risco de doença cardiovascular por supressão da expressão da selectina P nas plaquetas e redução do risco relativo de diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer (WIANOWSKA; GIL, 2018; UPADHYAY; RAO, 2013).

5.12 Atividade Antioxidante pelo método DPPH da TM de *Cocos nucifera* e derivadas homeopáticas

Atualmente existem vários métodos que avaliam a capacidade antioxidante total *in vitro*. Os ensaios baseados em transferência de elétrons, como o DPPH, medem a capacidade de um antioxidante em reduzir um oxidante, que muda de cor quando reduzido. Este método tem sido amplamente utilizado, pois requer um equipamento relativamente simples e fornece resultados rápidos e reprodutíveis (DUDONNÉ; VITRAC; COUTIÈRE; WOILLEZ; MÉRILLON, 2009).

Para avaliação da atividade antioxidante, a TM de *Cocos nucifera*, bem como suas derivadas nas escalas centesimal e decimal foram submetidas ao ensaio de DPPH. O resultado da atividade antioxidante da TM foi expresso em CE₅₀ (concentração necessária para atingir 50% do efeito máximo), obtido por meio de regressão linear de uma curva de calibração (Figura 24). A curva padrão da TM, obtida pela porcentagem de atividade antioxidante *versus* concentração, apresentou boa linearidade com um coeficiente de determinação (R²) de 0,9901. Desta forma, o valor de CE₅₀ encontrado para a TM foi de 91,90 ± 15,60 µg/mL. A rutina, utilizada como controle positivo, apresentou valor de CE₅₀ de 6,62 ± 1,62 µg/mL (10,84 µM). Os percentuais de atividade antioxidante para TM foram as seguintes: na concentração 50 µg/mL obteve-se 90,6%; 25 µg/mL obteve-se 88,1%; 12,5 µg/mL obteve-se 65,5%; 6,25 µg/mL obteve-se 35,07%; 3,12 µg/mL obteve-se 20,96% e 1,56 µg/mL obteve-se 10,0%.

De acordo com Simirgiotis (2016), valores de CE₅₀ menores ou iguais a 50 µg/mL indicam elevada atividade antioxidante para extratos, enquanto CE₅₀ entre 50 e 100 µg/mL são relacionados a atividades moderadas e valores maiores que 200 µg/mL à atividade antioxidante irrelevantes. Sendo assim, a atividade antioxidante da TM de *C. nucifera* é classificada como moderada.

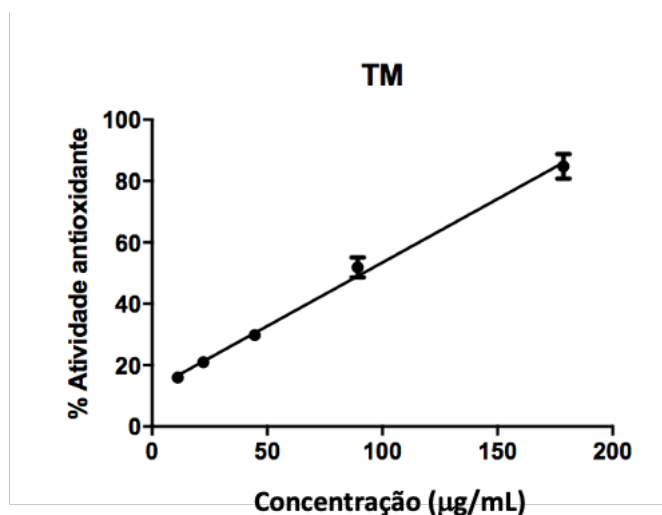


Figura 24. Curva de calibração (%atividade antioxidante x concentração) obtidas por regressão linear em ensaio (DPPH) (n=3) para a TM de *Cocos nucifera*.

Silva *et al.*, (2013) encontrou o valor de CE_{50} de $10,0 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ resultado para a atividade antioxidante do extrato das fibras de *Cocos nucifera*, muito diferente do que foi encontrado no presente trabalho. Já Dev *et al.* (2018) encontraram o valor de CE_{50} para o extrato etanólico do fruto de *Cocos nucifera* de $44,67\mu\text{g/ml}$, utilizando o método de DPPH. Chakraborty e Mitra (2008) encontraram para o extrato metanólico da fibra de coco verde valores de CE_{50} de $32,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$, para o coco no estágio jovem $45,4 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$, e por fim no coco maduro a CE_{50} foi $90,2 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$; como parâmetro para a análise utilizaram o ácido ascórbico com CE_{50} $22,7 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$. Por isso, divergências encontradas entre os resultados do presente trabalho e a literatura podem ser devidas ao emprego de diferentes processos extrativos para obtenção do derivado vegetal e diferentes concentrações da solução de DPPH (CASAGRANDE *et al.*, 2018). O método extrativo utilizado por Silva *et al.*, (2013) foi a infusão, seguida de liofilização das fibras de *Cocos nucifera*. Já neste trabalho foi produzida a TM em concentração de 10% da fibra fresca em veículo hidroalcoólico. Arivalagan e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antioxidante de 14 diferentes extratos, obtidos da mistura dos solventes água, metanol, metanol 80%, etanol, etanol 80%, acetona e acetona 80% sozinhos ou acidificado com 0,3 M HCl e encontraram valores de 20,3 a 476 μmol de trolox/g da fibra seca do coco desengordurada para os extratos de acetona e acetona a 80% acidificada, respectivamente. Apesar de não ser possível fazer uma comparação direta entre os resultados encontrados no presente trabalho e o descrito é possível perceber que o solvente e o método extrativo impactam fortemente nos resultados de atividade antioxidante. Além disso, ainda é necessário considerar fatores externos que influenciam o cultivo, como diferenças de clima, solo, presença ou não de água, luz e

predadores o que pode afetar a produção de metabolitos secundários e, portanto, a atividade antioxidante (Gobbo-Neto & Lopes, 2006).

O presente trabalho identificou diferentes compostos fenólicos como constituintes do mesocarpo de *Cocos nucifera*, que apresentam atividade antioxidante, como exemplo a catequina, epicatequina e ácido clorogênico. A ação antioxidante dos compostos fenólicos ocorre por diferentes mecanismos. Os polifenóis vegetais podem atuar como agentes redutores (sequestradores de EROs), antioxidantes doadores de hidrogênio, inibidores de oxigênio e agentes quelantes de metais envolvidos na formação de EROs (CHAKRABORTY; A MITRA, 2008).

Esta propriedade antioxidante está relacionada com o número e a posição do grupo hidroxila nos fenólicos. Os derivados do ácido caféico são considerados bons antioxidantes pois a estrutura do catecol doa os hidrogênios fenólicos ou elétrons aos aceptores, como grupos peroxil lipídico ou espécies reativas de oxigênio (CHAKRABORTY; A MITRA, 2008; NAVEED et al., 2018). De acordo com o número de grupos hidroxilas (OH) presentes há melhora na atividade antioxidante, sendo assim o ácido cafeico é mais ativo do que o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, como se pode observar na Figura 25 (KILANI-JAZIRI et al., 2016).

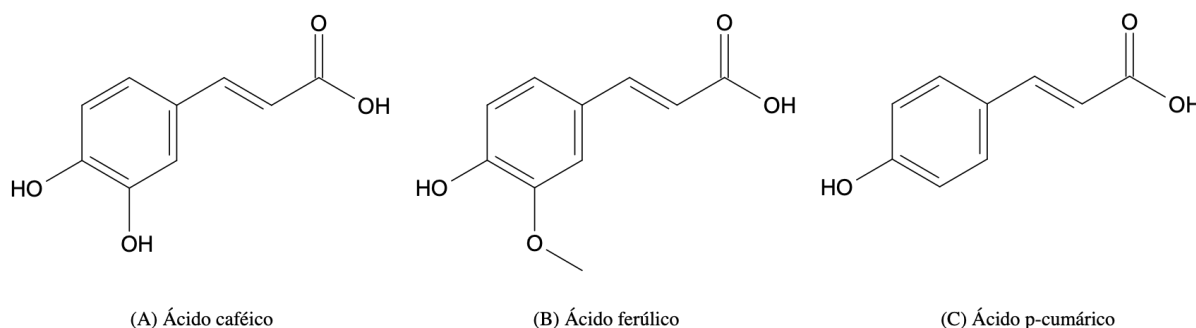


Figura 25. Estruturas químicas (A) ácido cafeico; (B) ácido ferúlico e (C) ácido p-cumárico.

Cocos nucifera L. apresenta o fruto composto por três camadas de exocarpo, mesocarpo e endocarpo que formam uma extensa ligação cruzada entre fenólicos, lignina e polissacarídeos. Entre os polifenóis, os derivados de cafeoila, como ácido clorogênico, apresentam forte atividade antioxidantes (CHAKRABORTY; A MITRA, 2008). Esta atividade também pode ser atribuída a presença de catequinas, uma vez que demonstrou exercer forte atividade sequestradora de radicais DPPH (CHO et al., 2003; ALVIANO, et al. 2004).

Substâncias com ação antioxidante são de grande aplicação no controle de doenças crônicas causadas por radicais livres (ALVIANO, et al. 2004). A presença/ausência de enzimas

antioxidantes pode estar relacionada a um efeito anti-inflamatório, uma vez que pode induzir a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, contribuindo para um processo inflamatório generalizado (SILVA et al., 2013). O processo inflamatório envolve a liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF- α que ativa monócitos e macrófagos e aumenta a permeabilidade vascular endotelial. *Cocos nucifera* demonstrou diminuir a liberação de TNF- α (SILVA et al., 2013). A atividade imunomoduladora pode estar relacionada com a capacidade antioxidante dos fenólicos presentes na composição de *Cocos nucifera* (KILANI-JAZIRI et al., 2016).

De posse dos resultados de atividade antioxidante para a TM de *C. nucifera*, procedeu-se a mesma avaliação para as derivadas homeopáticas nas potências centesimal e decimal com o objetivo de correlacionar esta atividade com o efeito imunomodulador e avaliar esta frente ao processo farmacotécnico homeopático. A Figura 26, mostra os resultados da atividade antioxidante para as derivadas homeopáticas na escala centesimal e decimal. Todos os ensaios foram realizados quatro vezes, em triplicatas e em equipamentos diferentes.

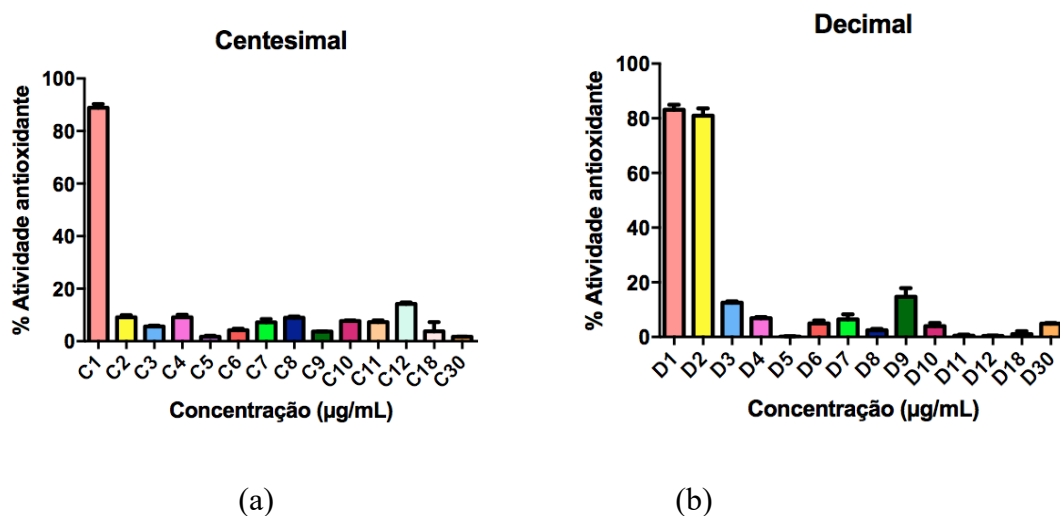


Figura 26. Atividade Antioxidante (%) das derivadas homeopáticas de *Cocos nucifera* nas escalas Centesimal (a) e Decimal (b).

Para as derivadas homeopáticas, os resultados foram apresentados em termos de porcentagem de atividade antioxidante, uma vez que não foi possível encontrar uma faixa linear de trabalho e conseqüentemente não foi possível o cálculo da CE₅₀.

Para as derivadas centesimais, apesar do processo de diluições na escala 1:100, seguido de sucessões, é possível notar que C2 apresenta atividade antioxidante estatisticamente semelhante a C4, C7, C8, C10 e C9, que C3 apresenta atividade antioxidante estatisticamente semelhante

a C6, C7, C9, C10, C11 e C18, já C4 apresenta a mesma atividade que C7, C8, C10 e C11 (Tabela 13). Nas derivadas decimais temos que D1 e D2 apresentam a mesma atividade antioxidante, apesar de ser 10 vezes mais diluída, D2, por sua vez, apresenta atividade antioxidante estatisticamente diferente a todas as outras potências avaliadas e D4 apresenta atividades semelhantes a D6-D8, D10 e D30. Estes resultados demonstram que apesar das diluições sucessivas, 1:100 ou 1:10 provenientes do processo farmacotécnico da homeopatia, de alguma forma o efeito da atividade antioxidante é mantido. Destaque para C5 e D4 que apresentam estatisticamente a mesma atividade antioxidante que C30 e D30, respectivamente, diluições de 10^{60} e 10^{15} . Com esses resultados claramente é possível perceber a ocorrência do efeito de hormese. A hormese é uma característica de muitos processos biológicos, nomeadamente uma resposta bifásica ou trifásica à exposição a quantidades crescentes ou decrescentes de uma substância ou doença. Esse efeito foi demonstrado pela ação de várias substâncias, naturais ou sintéticas, em baixas doses em vários modelos biológicos *in vitro* (CHIKRAMANE et al., 2017).

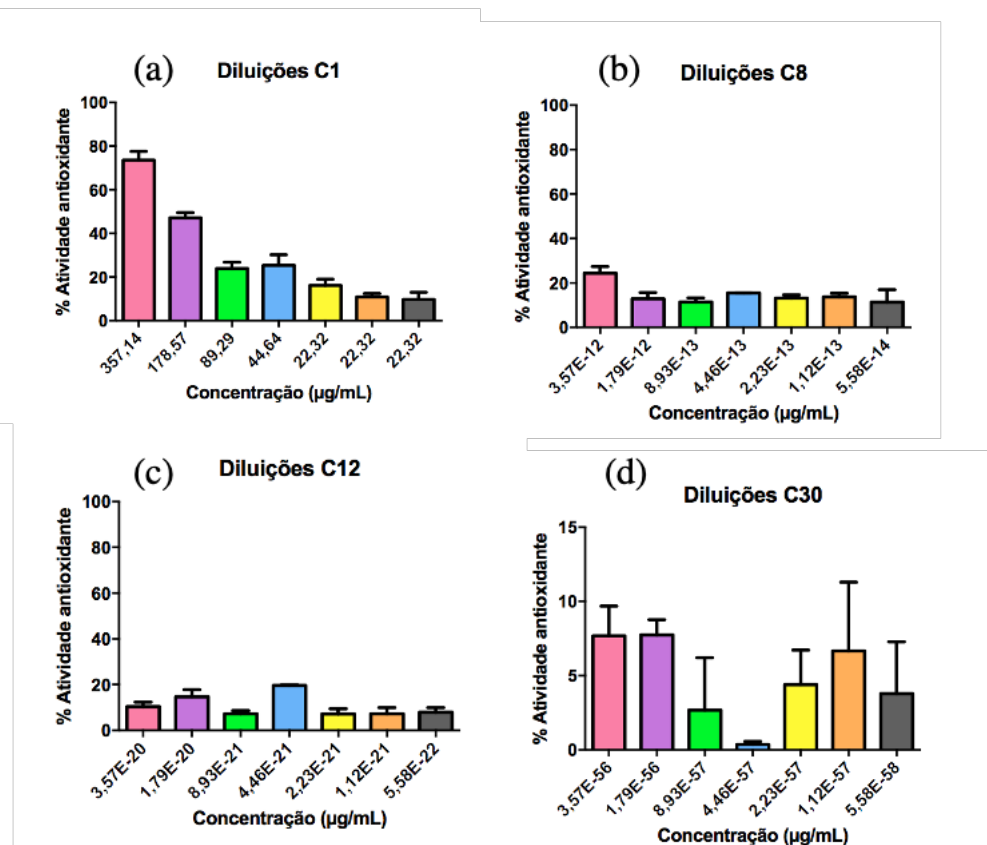
Tabela 13. Percentual de Atividade Antioxidante para as derivadas homeopáticas de *Cocos nucifera* nas escalas Centesimal e Decimal e diferença estatística entre elas.

Amostra	\bar{X} Atividade Antioxidante (%)	σ	Análise estatística	Amostra	\bar{X} Atividade Antioxidante (%)	σ	Análise estatística
CH1	88,90	1,42	A	D1	83,10	1,90	M
CH2	9,09	0,86	B	D2	80,97	2,65	M
CH3	5,62	0,32	C	D3	12,56	0,49	N
CH4	9,11	1,01	B,D	D4	6,86	0,45	O
CH5	1,71	0,38	E	D5	0,16	0,10	P
CH6	4,19	0,60	C,F	D6	4,92	1,16	O,P,Q
CH7	7,18	1,31	B,C,D,G	D7	6,49	1,79	O,Q,R
CH8	8,93	0,52	B,D,G,H	D8	2,49	0,46	O,P,Q,R,S
CH9	3,61	0,098	B,C,E,F,I	D9	14,73	3,12	N
CH10	7,69	0,25	B,C,D,G,H,J	D10	4,00	1,11	O,P,Q,R
CH11	7,32	0,63	C,D,G,H,J	D11	0,43	0,48	P,Q,S
CH12	14,14	0,55	K	D12	0,40	0,13	P,Q,S
CH18	3,82	3,48	C,F,I,L	D18	1,07	1,05	P,Q,S

CH30	1,69	0,10	E,F,I,L	D30	4,75	0,27	O,P,Q,S
------	------	------	---------	-----	------	------	---------

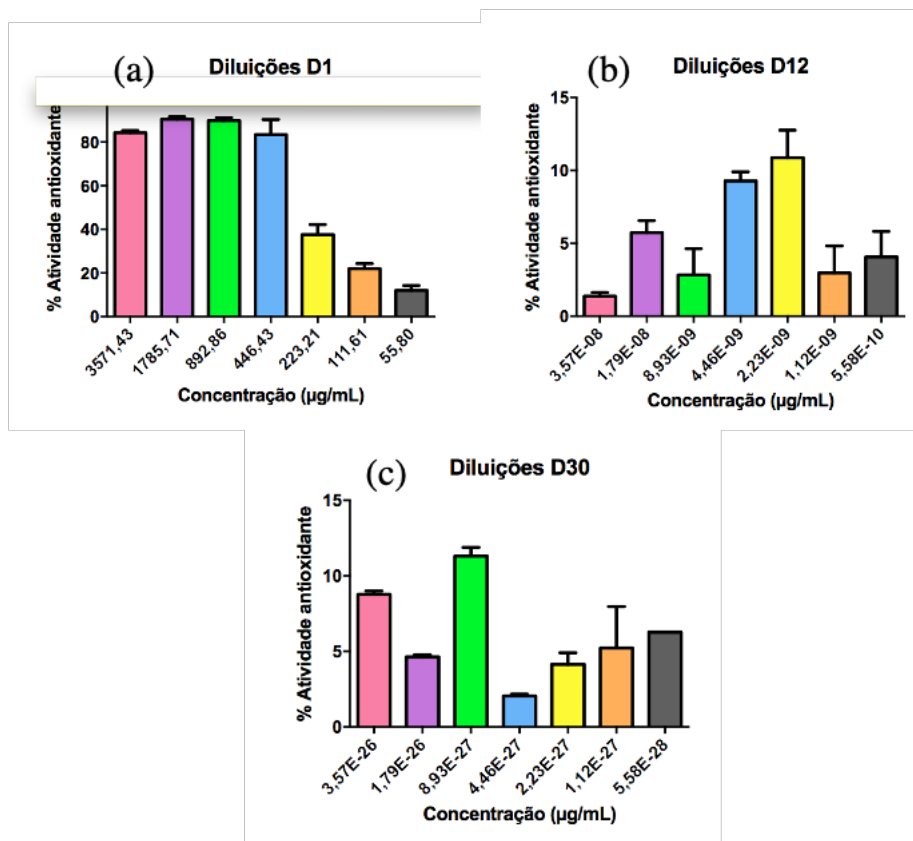
Diferentes letras na mesma coluna não apresentam diferenças estatísticas significativas. ANOVA, pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Além dos resultados descritos acima, para as derivadas homeopáticas centesimais e decimais, incluindo as diluições seriadas preparadas a partir das mesmas é possível perceber grandes oscilações da porcentagem de atividade antioxidante (Figuras 27 e 28). Essas oscilações são incomuns, uma vez que se espera que quanto menor a concentração de uma amostra menor sua atividade antioxidante, já que está diretamente relacionada à concentração de fenólicos, no caso de *C. nucifera*. Além disso, é possível observar um desvio padrão relativamente alto em algumas destas amostras. Entretanto, é importante ressaltar que formulações homeopáticas têm processo farmacotécnico diferente do usual e é sugerido que sua análise seja feita de forma diferente das demais preparações que possuem dose ponderal (BELLAVITE et al., 2014).



a: Diluições a partir de C1; b: Diluições a partir de C8; c: Diluições a partir de C12; d: Diluições a partir de C30.

Figura 27. Atividade antioxidante das derivadas centesimais de *Cocos nucifera* no ensaio (DPPH) (n=3).



a: Diluições a partir de D1; b: Diluições a partir de D12; c: Diluições a partir de D30.

Figura 28. Atividade antioxidante das derivadas decimais de *Cocos nucifera* no ensaio (DPPH) (n=3).

Como já foi descrito anteriormente, as derivadas homeopáticas são preparadas por diluições seguida de succussões, tendo como ponto de partida uma TM, e utilizando como insumo inerte a água ou misturas de água-etanol. O nível de diluição que será finalmente usado pode estar além do número de Avogadro, por exemplo, a probabilidade de até mesmo uma única molécula da TM estar presente na diluição é virtualmente zero (WOLF; WOLF; HEUSSER; THURNEYSSEN; BAUMGARTNER, 2011). Para explicação destes resultados incomuns, vários autores propuseram que formulações homeopáticas estão relacionadas com a teoria da mecânica quântica (TSITINIDIS e ALMIRANTIS, 2018).

De acordo com Bellavite (2003), a homeopatia pode ser relacionada com a ciência da complexidade, que fornece possíveis explicações de teorias e fenômenos sistêmicos globais. Esta teoria apresenta três principais propriedades: a não linearidade, a capacidade de auto-organização e a dinamicidade. Neste contexto, a não linearidade, inclui a falta de relação proporcional entre os resultados experimentais, como a ocorrência de fenômenos caóticos, com comportamento imprevisível e sensibilidade a pequenas perturbações (BELLAVITE, 2003).

Desta forma, a replicabilidade de todos os experimentos pode ser afetada por mudanças extremamente pequenas nas condições do próprio experimento. Respostas oscilatórias a uma formulação homeopática também foram observadas por Davenas *et al* (1988) ao estudar a intensidade da degranulação de basófilos em experimentos com *Arnica montana* (DAVENAS, BEAUVAIS E AMARA, 1988). Hyland e Lewith (2002) também observaram oscilações ao compararem o efeito da imunoterapia homeopática nas alterações dos sintomas induzidos pelo Verum, à substância potencializada à qual o paciente era alérgico.

Na tabela 13 é possível observar os resultados da atividade antioxidante para as derivadas homeopáticas na escala centesimal. É interessante observar que a oscilação da atividade antioxidante não pode ser relacionada com a concentração das soluções, uma vez que a derivada CH12, por exemplo, apresenta uma atividade estatisticamente superior a CH2, que em termos quantitativos é mais concentrada do que a CH12. Este resultado faz alusão à hipótese de não linearidade dos resultados experimentais e clínicos de diferentes potências. Outro resultado semelhante que chamamos atenção é que CH5, CH6 e CH9 não apresentam diferença estatística na atividade antioxidante quando comparada com CH30, considerada uma ultradiluição, mas tem atividade diferente de CH7, CH8, CH10. O mesmo fenômeno de não linearidade dos resultados ocorre para a escala decimal, como se pode verificar na tabela 13, a potência D3 é estatisticamente diferente de D4 a D8, D10, D11, D12, D18 e D30, mas é igual a D9 que em termos de concentração ponderal é mais diluída. Também podemos constatar que D4 apresenta atividade antioxidante superior a D5, D11, D12 e D18, mas é igual a D6, D7, D8, D10 e D30. Portanto podemos concluir que D4, é mais concentrada em termos de ponderabilidade que D30 e apresenta a mesma atividade antioxidante.

Desde os esforços de Benveniste para trazer luz ao entendimento da dinâmica existente na transferência de informação entre uma diluição e outra, a atenção dos pesquisadores tem-se voltado ao papel desempenhado pela água. A 'Memória da Água', uma expressão usada inicialmente pelo jornal *Le Monde*, após a publicação em 1988 do famoso artigo de Jacques Benveniste na revista científica *Nature*, é ainda um fenômeno inexplicado. Neste artigo ele afirma, com dados experimentais biológicos, que diluições homeopáticas de substâncias são capazes de induzir efeitos biológicos típicos da substância inicialmente dissolvida nela (ELIA; NAPOLI; GERMANO, 2007). Benveniste nomeia como 'biologia digital' a transmissão da atividade de uma solução potenciada de um agente farmacológico para água pura por meio de um sinal eletromagnético (TSITINIDIS e ALMIRANTIS, 2018).

Montaingnier *et al.*, (2011) apresentaram resultados surpreendentes em sua pesquisa de transmissão de sinais eletromagnéticos para a água pura. Em sua pesquisa, multicêntrica, conseguiu evidenciar consistentemente que é possível captar sinais eletromagnéticos emitidos por soluções potencializadas de DNA e ainda os transmitir a água pura, que foi exposta apenas a indução eletromagnética. O grupo demonstrou que as informações da sequência de DNA podem ser transmitidas para a água pura e, sem um molde de DNA, sintetizaram a sequência de DNA específica a síntese de DNA (98% idêntica ao original) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Um grande número de pesquisas científicas vem sendo desenvolvidas, e atualmente as evidências mais consistentes para elucidar a transmissão da informação por meio das diluições homeopáticas apontam para as hipóteses de Domínio de Coerência Quântica e a hipótese da dinâmica de clusters de água. A teoria dos Domínios de Coerência Quântica, foi desenvolvida por Preparata e Del Giudice e prevê a formação de regiões estáveis de água ou domínios em água. Esses domínios, por transportarem algumas informações por meio de um fenômeno eletromagnético quântico, relacionadas ao material potencializado, poderiam explicar as propriedades de preparações homeopáticas (TOURNIER *et al.*, 2021).

Na teoria das nanopartículas, as nanopartículas de elementos correspondentes ao material de partida podem estar presentes mesmo em preparações homeopáticas altamente diluídas. Várias técnicas analíticas têm sido utilizadas na busca desta hipótese e relatam a presença de nanopartículas em geral e, no caso de metais, traços do material original e mesmo em níveis de diluição ultramolecular. Essa hipótese expõe que os elementos vestigiais do material original persistem no processo de diluição/sucussão, possivelmente por mecanismo de “flotação de espuma”, e formam a base para os efeitos medicinais específicos (TOURNIER, *el al.*, 2021).

Uma hipótese que poderia explicar estes resultados seria a teoria da Difusão ou movimento Browniano, resultado da tese de Doutorado de Albert Einstein. A difusão pode ser definida como *o processo pelo qual a matéria é transportada de um local para o outro situada no interior do próprio sistema e resulta de movimentos moleculares aleatórios que ocorrem em pequenas distâncias*. O Movimento Browniano resulta do impacto entre as moléculas do fluido e as partículas suspensas, que adquirem deste modo a mesma energia cinética que as moléculas. Assim, os movimentos de uma partícula suspensa e de uma molécula do fluido são qualitativamente iguais. Deste modo admite-se que haja transferência de energia na ausência

de sucussão, caso se conceda a solução um período de repouso para que se dissemine o movimento molecular (VIEIRA, 2018).

5.13 Avaliação da atividade imunomoduladora de *Cocos nucifera* TM e derivadas homeopáticas

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo, que apresenta os sinais clínicos característicos como rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Sua finalidade é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (CRUNIVEL et al., 2010). Durante a resposta inflamatória, ocorre um influxo de monócitos circulantes no sangue para o tecido. Estes monócitos são ativados e tornam-se macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, liberam citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas, além de produzirem EROs, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e intermerdiários reativos do nitrogênio como o óxido nítrico (NO) (CRUNIVEL et al., 2010; HELMING, 2011).

Atualmente os macrófagos são caracterizados em 3 tipos: os macrófagos clássicos (M1), com atividade fagocítica, secretam grandes quantidades de citocinas (ex.:TNF e IL-12) e mediadores pro-inflamatórios (ex.: óxido nítrico). O segundo tipo (M2), alternativamente ativado por IL-4, estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, pois expressam citocinas angiogênicas (ex.: fator de crescimento vascular endotelial) e imunomoduladoras (ex.: IL-10). O terceiro tipo (M3) são os macrófagos cicatrizantes, exercem atividade reguladora mediante liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória e apoiam a reparação de tecidos. A IL-10 é produzida também por células imunoativas, principalmente monócitos e linfócitos, e tem sido considerada uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias imunorreguladoras. A secreção de IL-10 é retardada e sempre segue a de fatores pró-inflamatórios com latência de algumas horas (AMPARO, 2020; CRUNIVEL et al., 2010; MOSSER & EDWARDS, 2008). A IL-6 é uma citocina multifuncional, que é secretada por vários tipos de células, principalmente células T, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas, adipócitos e hepatócitos. Além disso, a IL-6 regula / estimula a produção de moléculas de adesão celular, mediadores quimiotáticos e proteínas de fase aguda e medeia a liberação de outras citocinas que amplificam a resposta inflamatória (RODRIGUES *et al.* 2017).

Assim, avaliou-se a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora em ensaio de dosagem da produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 em culturas de macrófagos estimuladas por LPS para a TM

de *C. nucifera* nas concentrações de 100 e 250 µg/mL e as derivadas homeopáticas (CH1, CH4, CH8, CH12 e D1, D3 e D9) em suas concentrações de produção (AMPARO, 2020; TORRES-RODRIGUÉZ et al., 2016).

5.13.1 Avaliação citotoxicidade

Os resultados de citotoxicidade de *Cocos nucifera* TM e suas derivadas homeopáticas para macrófagos da linhagem RAW 264.7 por 24 h e 48 h, calculados em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas) estão demonstrados nas figura 29 e tabela 14.

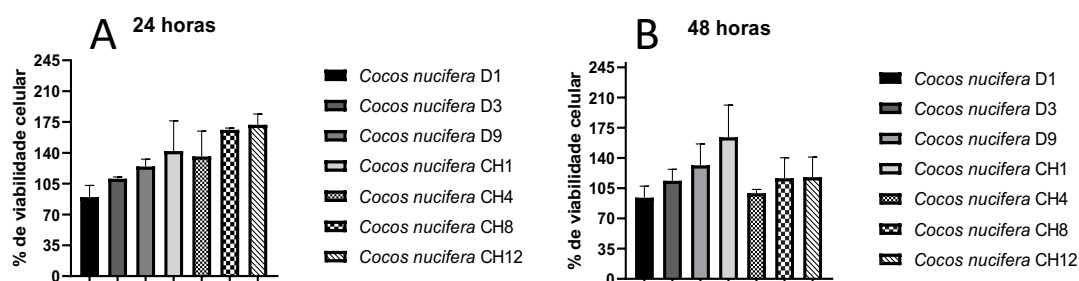


Figura 29. Citotoxicidade das derivadas homeopáticas *Cocos nucifera* (D1, D3, D9, CH1, CH4, CH8, CH12) para macrófagos 264.7 em 24h (A), 48h (B) de tratamento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão das quadruplicatas.

De acordo com o guia internacional ISO 10993-5, uma redução na viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico (ISO, 2009). Dessa forma, a TM e derivadas homeopáticas de *Cocos nucifera* não apresentaram efeito citotóxico em nenhum tempo de tratamento e foram utilizadas nos experimentos para avaliação da atividade anti-inflamatória por meio da inibição de citocinas. A solução glicérica utilizada para produção das derivadas homeopáticas foi utilizada como controle negativo.

Tabela 14. Resultado da avaliação da citotoxicidade de TM de *Cocos nucifera* em macrófagos RAW 264.7.

Amostra	CC ₅₀ sobre macrófagos	CC ₅₀ sobre macrófagos
	RAW 264.7 (24 h)	RAW 264.7 (48 h)
<i>Cocos nucifera</i> TM	>5,00 mg/mL	>5,00 mg/mL
Solução glicerinada 5%(CN)	-	-

Legenda: *Cocos nucifera* TM solubilizada em meio RPMI contendo 2,0% de dimetil sulfoxido (DMSO) nas concentrações de (5,00 a 0,04 mg/mL); -: Ausência de citotoxicidade.

5.13.2 Avaliação atividade antiinflamatória quanto à dosagem de citocinas (Interleucina 6, 10 e TNF- α)

Após a avaliação da citotoxicidade, selecionou-se as concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ da TM de *C. nucifera*. Ambas as concentrações da TM inibiram a produção de TNF- α , como pode ser visto na figura 30. As derivadas homeopáticas não foram capazes de inibir a produção de TNF- α , porém pode-se observar na figura que elas reduzem esta secreção quando comparadas com as células estimuladas por LPS/INF- γ . Na análise dos resultados pode-se observar que a derivada D9 exerce um efeito supressor maior do que a derivada D3. Da mesma forma pode-se observar que a derivada CH12 exerce um efeito supressor maior do que a CH8 e CH4, que demonstram atividade semelhante, mesmo a CH8 sendo mais diluída que CH4.

Pode-se observar também que a TM de *Cocos nucifera* nas concentrações 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a níveis basais da produção de IL-6. Dentre as derivadas homeopáticas analisadas, apenas a D1 exerce um efeito discreto na redução desta citocina quando comparadas com as células estimuladas por LPS/INF- γ . As demais derivadas apresentam um efeito estimulante desta citocina. As derivadas homeopáticas CH12 e D3 foram as que mais estimularam a produção desta citocina. Percebe-se ainda que a CH1 e CH4 apresentam atividade semelhantes, e a CH8 demonstra atividade estimulante maior do que a CH1, CH4 e D9.

Na análise dos resultados para a IL-10 pode-se observar que *Cocos nucifera* nas concentrações 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a liberação desta citocina quando comparado com as células estimuladas por LPS/INF- γ , assim como todas as derivadas homeopáticas. Pode-se observar

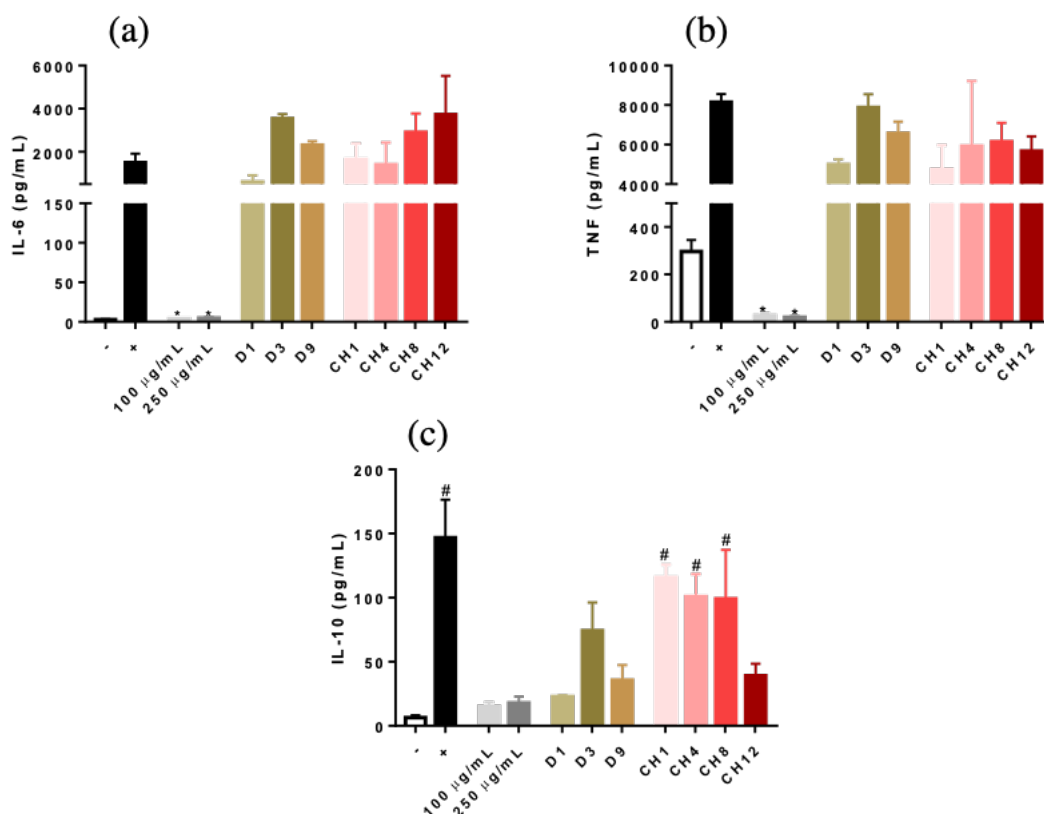


Figura 30. Quantificação de citocinas (a)IL-6, (b) TNF e (c) IL-10 em sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 não estimulados (-) ou estimulados (+) com LPS+IFN- γ , tratados com *Cocos nucifera* 48 horas. Resultados expressos como média e desvio padrão das quadruplicatas. # $p < 0,05$ em relação às células não estimuladas; * $p < 0,05$ em relação às células estimuladas com LPS+IFN- γ .

também que a D1 exerce um efeito muito próximo da TM de *Cocos nucifera*, mesmo sendo 10 vezes mais diluída. Chama-se atenção também que a derivada D9 exerce um efeito superior a D3, cuja atividade antioxidante foi estatisticamente igual para ambas. Destaca-se ainda a capacidade de inibição da IL-10 da derivada CH12 que é maior do que as demais derivadas com exceção da D1 e D9.

Sendo assim, foi possível concluir que a TM de *C. nucifera* possui atividade de inibição das citocinas pro-inflamatórias IL-6, TNF e anti-inflamatória IL-10. Já as derivadas homeopáticas demonstram resultados variáveis. No TNF, D3 e D9 demonstraram modulação pela inibição, tendo D9 efeito superior, chama-se atenção que na avaliação da atividade antioxidante D3 e D9 demonstraram atividades semelhantes (Tabela 13). Já CH12 demonstrou maior inibição que CH8 e CH4, que por sua vez têm efeitos antioxidantes semelhantes. Comparativamente a

atividade antioxidante, CH12 demonstrou maior atividade inibitória do TNF e CH4 e CH8 efeitos semelhantes. Para IL-6 o mesmo efeito inibitório da produção é observado para TM e D1, mas em todas as outras derivadas há um efeito estimulante, com destaque para CH12 e D3, corroborando com o resultado da atividade antioxidante. Devido a estes resultados observados era esperado que houvesse um aumento na produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, mas efeito contrário foi observado, pois houve uma inibição da produção da mesma, com destaque para TM e D1, que apesar de ser 10 vezes diluída apresenta resultado de inibição semelhante. Destaca-se que na atividade antioxidante D3 e D9 tiveram atividades iguais, mas com IL-10, D9 teve resultado de inibição superior. Já nas derivadas centesimais, CH12, que demonstrou maior atividade antioxidante, apresentou maior inibição que a maioria das derivadas.

Estes resultados, mais uma vez, demonstram que a TM de *Cocos nucifera* e suas derivadas são capazes de modular o sistema imune, diminuindo a atividade pro-inflamatória por meio de regulação de citocinas envolvidas no processo inflamatório. Destaca-se também que apesar das diluições sucessivas das derivadas homeopáticas (1:100 ou 1:10) provenientes do processo farmacotécnico da homeopatia, de alguma forma o efeito da atividade nas citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias é mantido, assim como na atividade antioxidante.

Na TM de *Cocos nucifera*, identificou-se, no presente trabalho, a presença de vários ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos, como o ácido caféico, ácido gálico, ácidos p-cumárico e o ácido ferúlico apresentam um notável efeito antioxidante e é relatada a capacidade de modular o sistema imunológico via supressão de proteína ativada por mitogênio (MAP) quinases e vias de sinalização de NF-kB. O ácido cafeico, em especial, apresenta a propriedade de reduzir várias citocinas inflamatórias (KILANI-JAZIRI et al., 2016).

6. CONCLUSÃO

Foi realizado a caracterização físico-química da tintura mãe (TM) de *Cocos nucifera*. Foi possível determinar a cor castanho avermelhada para TM e amarelo claro para a D1 e C1 obtidas. As demais derivadas produzidas são transparentes. A TM apresenta o pH aproximado de 5,5, ácido, devido aos fenólicos constituintes químicos característicos presentes no extrato. A densidade relativa encontrada para TM foi de 0,9185g/mL, dentro da normalidade para tinturas. O teor de resíduo seco do extrato vegetal é 1,95%. A TM de *C. nucifera* é rica em fenólicos e demonstrou um teor de taninos totais de 2,28%.

A análise por espectroscopia no ultravioleta da TM e derivadas de *C. nucifera* evidenciou absorção com comprimento onda máximo de aproximadamente de 210 e 300 nm. Essa absorção é característica da presença de fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. As derivadas homeopáticas C1 e D1 apresentaram absorções no espectro de UV semelhantes a TM, sendo possível o controle de qualidade qualitativo por essa técnica, o que não é possível para as demais derivadas avaliadas, D6, D12, C6 e C12. Com a utilização da espectroscopia no IV foi possível confirmar informações sobre a constituição química e fornecer uma impressão digital da TM de *C. nucifera*, mas não foi uma boa técnica para análise das derivadas trituradas C1-C3.

A composição química da TM de *C. nucifera*, foi avaliada por CCD, CLAE-DAD e UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. Foi possível o desenvolvimento de um método por CCD para análise qualitativa da TM, utilizando como substâncias de referência a catequina, epicatequina e ácido clorogênico. Por CLAE e LC-MS foi possível a identificação de 9 substâncias fenólicas na TM: ácido hidróxibenzóico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, 3 isômeros do ácido cafeoilchiquímico, 2 derivados do ácido cafeoilchiquímico e os flavonoides xanthorhamnina e cianidina-*O*-hexosídeo/miricetina-*O*-pentosídeo.

A tintura e derivadas homeopáticas nas escalas centesimais e decimais apresentaram atividade antioxidante *in vitro*. Concluiu-se por este ensaio que o processo farmacotécnico de produção das derivadas, apesar de ultrapassarem o Número de Avogadro (C12), mantém a atividade antioxidante encontrada e demonstram o fenômeno de hormese. Ao mesmo tempo, demonstrou-se a não linearidade, com oscilação dos resultados desta atividade nas diferentes derivadas nas duas escalas, corroborando com a hipótese de que o processo de obtenção das derivadas homeopáticas pode ser enquadrado na ciência da complexidade. Onde é possível observar a não

linearidade, auto-organização e dinamicidade das derivadas. Algumas hipóteses podem explicar essas características como a memória da água e o movimento Browniano molecular.

As TM de *Cocos nucifera* e suas derivadas são capazes de modular o sistema imune, diminuindo a atividade de citocinas pro-inflamatórias, TNF e IL-6 e anti-inflamatória IL-10. Destaca-se mais uma vez, por diferente modelo de ensaio, que apesar das diluições sucessivas das derivadas homeopáticas provenientes do processo farmacotécnico da homeopatia, de o efeito da atividade nas citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias é mantido, assim como na atividade antioxidante.

Dessa forma, conclui-se que a TM de *Cocos nucifera* e suas derivadas homeopáticas, na centesimal e decimal, possuem potencial atividades antioxidante e imunomoduladora *in vitro*, sendo candidatos para serem estudadas em outros modelos e em ensaios clínicos para sua utilização como imunomodulador e para o tratamento de doenças inflamatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINPELU, David et al. Probable mechanisms of biocidal action of *Cocos nucifera* Husk extract and fractions on bacteria isolates. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-9, 14 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0634-3>.

ABUD, Ana Paula Ressetti *et al.* Activation of bone marrow cells treated with Canova in vitro. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 808-816, out. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.06.011>.

AITA, Sara Elsa; CAPRIOTTI, Anna Laura; CAVALIERE, Chiara; CERRATO, Andrea; MONETA, Benedetta Giannelli; MONTONE, Carmela Maria; PIOVESANA, Susy; LAGANÀ, Aldo. Andean Blueberry of the Genus *Disterigma*: a high-resolution mass spectrometric approach for the comprehensive characterization of phenolic compounds. **Separations**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 58, 2 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/separations8050058>.

AL-ADHROEY, Abdulelah H. et al. Evaluation of the use of *Cocos nucifera* as antimalarial remedy in Malaysian folk medicine. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 134, n. 3, p.988-991, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.026>.

ANOUAR, El Hassane; GIERSCHNER, Johannes; DUROUX, Jean-Luc; TROUILLAS, Patrick. UV/Visible spectra of natural polyphenols: a time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 79-89, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.034>.

APPAIAH, Prakruthi *et al.* Composition of Coconut Testa, Coconut Kernel and its Oil. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [S.L.], v. 91, n. 6, p. 917-924, 22 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-014-2447-9>.

APPAIAH, Prakruthi *et al.* Phytochemicals and antioxidant activity of testa extracts of commercial wet and dry coconuts and cakes. **International Research Journal Of Pharmacy**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 9-13, 12 out. 2016. Moksha Publishing House. <http://dx.doi.org/10.7897/2230-8407.079106>.

ARIVALAGAN, M. *et al.* Extraction of phenolic compounds with antioxidant potential from coconut (*Cocos nucifera* L.) testa and identification of phenolic acids and flavonoids using

UPLC coupled with TQD-MS/MS. *Lwt*, [S.L.], v. 92, p. 116-126, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.024>.

BANKAR, Girish *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effect of *Cocos nucifera* Linn. endocarp on isolated rat thoracic aorta and DOCA salt-induced hypertensive rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 134, n. 1, p. 50-54, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.047>.

BELLAVITE, Paolo *et al.* High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. **Homeopathy**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 4-21, jan. 2014. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.003>.

BELLAVITE, Paolo *et al.* High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**, [s.l.], v. 103, n. 1, p.22-43, jan. 2014. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.002>.

BELLAVITE, Paolo *et al.* Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.441-452, 2005. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh141>.

BELLAVITE, Paolo; MARZOTTO, Marta; OLIOSO, Debora; MORATTI, Elisabetta; CONFORTI, Anita. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 22-43, jan. 2014. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.002>.

BENASSI, Antonio Carlos. **Caracterizações biométrica, química e sensorial de frutos de coqueiro variedade anã verde**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105304>. Acesso em: 30 nov. 2019.

BETTI, Lucietta *et al.* Basic research in homeopathy and ultra-high dilutions: what progress is being made?. **Homeopathy**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.151-154, abr. 2013. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2013.01.002>.

BRAMBILLA, Daria *et al.* The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-9, 30 set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-7-29>.

BRASIL *et al.* **FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. 858 p. (Volume 1). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 jun. 2019.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (org.). **FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA**. 3. ed. Brasília: Anvisa, 2011. 364 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-homeopatica/arquivos/8048json-file-1>. Acesso em: 04 fev. 2019.

CASAGRANDE, Maira; ZANELA, Juliano; WAGNER, Américo; BUSSO, Cleverson; WOUK, Jéssica; IURCKEVICZ, Genice; MONTANHER, Paula Fernandes; YAMASHITA, Fabio; MALFATTI, Carlos Ricardo Maneck. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: in vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 125, p. 207-219, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.088>.

CHAKRABORTY, M; A MITRA,. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 107, n. 3, p. 994-999, 1 abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.083>.

CHIKRAMANE, Prashant S.; SURESH, Akkihebbal K.; KANE, Shantaram G.; BELLARE, Jayesh R.. Metal nanoparticle induced hormetic activation: a novel mechanism of homeopathic medicines. **Homeopathy**, [S.L.], v. 106, n. 03, p. 135-144, ago. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2017.06.002>.

CHIKRAMANE, Prashant Satish et al. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. **Homeopathy**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.231-242, out. 2010. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2010.05.006>.

CLARKE, John O.; MULLIN, Gerard E.. A Review of Complementary and Alternative Approaches to Immunomodulation. **Nutrition In Clinical Practice**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 49-62, fev. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1177/011542650802300149>.

CORRÊA, A.d.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.e.m.. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.347-351, dez. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42301997000400013>.

COSTA, C.t.c. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on intestinal nematodes of mice. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.101-103, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.008>.

COSTA, Cícero Temístocles Coutinho et al. TOXICOLOGICAL ACTIVITY EVALUATION OF *Cocos nucifera* L. IN EXPERIMENTAL MODELS. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, n. 21, p.35-44, 2011.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.434-447, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042010000400008>.

CUNHA, Aline Gonzaga. **Avaliação do efeito do processamento térmico na composição química da água de coco por GC-MS, LC-MS e NMR**. 2019. 63 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

DAVENAS, E.; BEAUVAIS, F.; AMARA, J.; OBERBAUM, M.; ROBINZON, B.; MIADONNAI, A.; TEDESCHI, A.; POMERANZ, B.; FORTNER, P.; BELON, P.. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. **Nature**, [S.L.], v. 333, n. 6176, p. 816-818, jun. 1988. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/333816a0>.

DEBMANDAL, Manisha; MANDAL, Shyamapada. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae). **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.241-247, mar. 2011. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60078-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60078-3).

DEV, Shrabanti *et al.* Evaluation of antioxidant and chemopreventive effect of *Cocos nucifera* L. **Jahangirnagar University Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 47-58, 7 maio 2018. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/jujbs.v6i2.36590>.

DEY, Gargi; CHAKRABORTY, Moumita; MITRA, Adinpunya. Profiling C6–C3 and C6–C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 162, n. 4, p.375-381, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2004.08.006>.

DRAPIER-BECHE, N.; FANNI, J.; PARMENTIER, M.. Physical and Chemical Properties of Molecular Compounds of Lactose. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 82, n. 12, p. 2558-2563, dez. 1999. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75510-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75510-4).

DUDONNE, Stephanie; VITRAC, Xavier; COUTIERE, Philippe; WOILLEZ, Marion; ME?RILLON, Jean-Michel. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 11 mar. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf803011r>.

DUTTA, Ranjna C. Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. **Immunology Letters**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 153-161, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00066-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00066-4).

ELIA, V.; NAPOLI, E.; GERMANO, R.. The 'Memory of Water': an almost deciphered enigma. dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. **Homeopathy**, [S.L.], v. 96, n. 3, p. 163-169, jul. 2007. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2007.05.007>.

ESQUENAZI, Daniele et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 10, p.647-652, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01377-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01377-3).

FISCHER, Roman; MAIER, Olaf. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: role of tnf. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2015, p. 1-18, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/610813>.

FLAMINI, Riccardo. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 218-250, jul. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.10052>.

FLEENOR, Bradley S.; CARLINI, Nicholas A.; CAMPBELL, Marilyn S.. Curcumin and arterial function in health and disease. **Current Opinion In Clinical Nutrition & Metabolic Care**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 459-464, nov. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0000000000000598>.

FONSECA, Patrícia da *et al.* Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 271-277, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322008000200012>.

FREIRE, Gilson. **O VITALISMO EM HOMEOPATIA**. 2008. Disponível em: <<https://www.gilsonfreire.med.br/index.php/homeopaticos/vitalismo-em-homeopatia>>.

Acesso em: 10 jan. 2019.

FULLERTON, James N.; GILROY, Derek W.. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 551-567, 29 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.39>.

GANDHI, M. *et al.* Prophylactic effect of coconut water (*Cocos nucifera* L.) on ethylene glycol induced nephrocalcinosis in male wistar rat. **International Braz J Urol**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 108-117, jan. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2013.01.14>.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 374-381, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200026>.

GRASEL, Fábio dos Santos; FERRÃO, Marco Flôres; WOLF, Carlos Rodolfo. Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 91, p. 279-285, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.022>.

GUO, Yuan *et al.* Rapid Analysis of Corni fructus Using Paper Spray-Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 344-350, 26 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2681>.

HAHNEMANN, Samuel. **Organon da Arte de Curar**. 6. ed. São Paulo: Gehsp Bento Mure, 2007. 221 p. (CDD 615.532). Tradução: David Castro, Rezende Filho, Kamil Curi.

HENRIQUES, Bárbara O. *et al.* In Vitro TNF- α Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron*. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2016, p.1-15, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9872598>.

HOLANDINO, Carla *et al.* Structural and thermal analyses of zinc and lactose in homeopathic triturated systems. **Homeopathy**, [s.l.], v. 106, n. 3, p.160-170, ago. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2017.06.003>.

HORAI, Hisayuki; ARITA, Masanori; KANAYA, Shigehiko; NIHEI, Yoshito; IKEDA, Tasuku; SUWA, Kazuhiro; OJIMA, Yuya; TANAKA, Kenichi; TANAKA, Satoshi; AOSHIMA, Ken. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal Of Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 45, n. 7, p. 703-714, 7 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1777>.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7121, p.860-867, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05485>.

JENSEN, Jacob S.; EGEBO, Max; MEYER, Anne S.. Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 56, n. 10, p. 3493-3499, 29 abr. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf703573f>.

KILANI-JAZIRI, Soumaya; MOKDAD-BZEOUICH, Imen; KRIFA, Mounira; NASR, Nouha; GHEDIRA, Kamel; CHEKIR-GHEDIRA, Leila. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study. **Drug And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 416-424, 18 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2016.1252919>.

KIRSZBERG, Clarice *et al.* The effect of a catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 17, n. 9, p. 1054-1058, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1297>.

KLEIN, Sabine D. et al. Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: A Systematic Review and Bibliometric Analysis—Part 1. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.409-421, maio 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2017.0249>.

KOSCHEK et al. The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. **Brazilian Journal Of Medical Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 40, p.1339-1343, 2007.

KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 217-233, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>.

LIANG, Ningjian; KITTS, David. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. **Nutrients**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 16, 25 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8010016>.

LIMA, E.b.c. et al. Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 48, n. 11, p.953-964, nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20154773>.

LOCH-NECKEL, Gecioni; CARMIGNAN, Françoise; CREPALDI, Maria Aparecida. A homeopatia no SUS na perspectiva de estudantes da área da saúde. **Revista Brasileira de Educação Médica**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.82-90, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-55022010000100010>.

MACHADO, Paulo R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.647-662, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962004000600002>.

MANDAL, Santi M. et al. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coc. **Peptides**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.633-637, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.001>.

MENDONÇA-FILHO, Ricardo R. et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of Cocos nucifera Linn. (Palmae). **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 155, n. 3, p.136-143, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2003.12.001>.

MIGUES, Vitor Hugo. **Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise multivariada no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos**. 2018. 447 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/28044>. Acesso em: 18 abr. 2021.

MONTAGNIER, L; AISSA, J; GIUDICE, E del; LAVALLEE, C; A TEDESCHI,; VITIELLO, G. DNA waves and water. **Journal Of Physics: Conference Series**, [S.L.], v. 306, p. 012007, 8 jul. 2011. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/306/1/012007>.

MONTEIRO, Dalva de Andrade; IRIART, Jorge Alberto Bernstein. Homeopatia no Sistema Único de Saúde: representações dos usuários sobre o tratamento homeopático. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.1903-1912, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2007000800017>.

NASCIMENTO, André Márcio. **Avaliação da Qualidade de Extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais.

NASKAR, Sagar *et al.* Evaluation of antihyperglycemic activity of *Cocos nucifera* Linn. on streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 138, n. 3, p. 769-773, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.021>.

NAVEED, Muhammad; HEJAZI, Veghar; ABBAS, Muhammad; KAMBOH, Asghar Ali; KHAN, Ghulam Jilany; SHUMZAID, Muhammad; AHMAD, Fawwad; BABAZADEH, Daryoush; FANGFANG, Xia; MODARRESI-GHAZANI, Faezeh. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 97, p. 67-74, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.

NUNES-PINHEIRO, Diana Célia Sousa *et al.* ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS PLANTAS MEDICINAIS: PERSPECTIVAS EM MEDICINA VETERINÁRIA. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 15, n. 13, p.23-32, 2003. Disponível em: <<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo3.2003.1.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

NUNES-PINHEIRO, Silva *et al.* Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de *Cocos nucifera* L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p.429-434, 25 maio 2009.

OLIVEIRA, Mônica B.; VALENTIM, Iara B.; SANTOS, Tauane R.; XAVIER, Jadriane A.; FERRO, Janylle N.s.; BARRETO, Emiliano O.; SANTANA, Antônio E.G.; MELO, Lucília V.; BOTTOLI, Carla B.G.; GOULART, Marília O.F.. Photoprotective and antiglycation activities of non-toxic *Cocos nucifera* Linn. (Arecaceae) husk fiber ethanol extract and its phenol chemical composition. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 162, p. 113246, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113246>.

ORTEGA-GÓMEZ, Almudena; PERRETTI, Mauro; SOEHNLEIN, Oliver. Resolution of inflammation: an integrated view. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 661-674, 17 abr. 2013. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201202382>.

PALLADINO, Michael A.; BAHJAT, Frances Rena; THEODORAKIS, Emmanuel A.; MOLDAWER, Lyle L.. Anti-TNF- α therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug**

Discovery, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 736-746, set. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1175>.

PANTOJA-CASTRO, Mayra; GONZALEZ-RODRIGUEZ, Horacio. Study by infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis of Tannins and Tannic acid. **Rev. Latinoam. Quím**, Naucalpan de Juárez, v. 39, n. 3, p. 107-112, 2011. Anual.

PIAZZON, A.; VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; MATTIVI, F.; MANDOJ, F.; NARDINI, M.. Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Their Metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 60, n. 50, p. 12312-12323, 4 dez. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf304076z>.

PREETHA, P. P. *et al.* Antihyperlipidemic effects of mature coconut water and its role in regulating lipid metabolism in alloxan-induced experimental diabetes. **Comparative Clinical Pathology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 1331-1337, 20 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-013-1784-7>.

RAMIRO-PUIG, Emma; CASTELL, Margarida. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 101, n. 7, p. 931-940, 6 jan. 2009. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114508169896>.

RENJITH, Rs *et al.* Cytoprotective, antihyperglycemic and phytochemical properties of *Cocos nucifera* (L.) inflorescence. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 804-810, out. 2013. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(13\)60142-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(13)60142-x).

RIBEIRO FILHO, Ariovaldo. A Institucionalização da Homeopatia no Brasil. **Revista de Homeopatia**, São Paulo, v. 71, n. 1, p.70-73, 2008.

RINALDI, Sebastian *et al.* Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Pal. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 122, n. 3, p.541-546, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.024>.

ROLLEMBERG, Carla Virginia Vieira. Homeopatia:: como entender sua conjuntura. **Revista Homeopatia Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p.1-10, 2019. Semestral. Disponível em: <<http://ihb.hospedagemdesites.ws/ojs/index.php/artigos/issue/archive>>. Acesso em: 10 out. 2019.

ROOPAN, Selvaraj Mohana. An Overview of Phytoconstituents, Biotechnological Applications, and Nutritive Aspects of Coconut (*Cocos nucifera*). **Applied Biochemistry And**

Biotechnology, [s.l.], v. 179, n. 8, p.1309-1324, 6 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2067-y>.

SAWADA, Yuji; NAKABAYASHI, Ryo; YAMADA, Yutaka; SUZUKI, Makoto; SATO, Muneo; SAKATA, Akane; AKIYAMA, Kenji; SAKURAI, Tetsuya; MATSUDA, Fumio; AOKI, Toshio. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific ms/ms-based data resource and database. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 82, p. 38-45, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.007>.

SCALBERT, Augustin. Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues. **Plant Polyphenols**, [S.L.], p. 259-280, 1992. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-3476-1_15.

SCHMIDT, Josef M.. New approaches within the history and theory of medicine and their relevance for homeopathy. **Homeopathy**, [s.l.], v. 103, n. 2, p.153-159, abr. 2014. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.007>.

SHARMA, Preeti et al. Immunomodulators: Role of medicinal plants in immune system. **National Journal Of Physiology, Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.552-556, 2017. ScopeMed International Medical Journal Management and Indexing System. <http://dx.doi.org/10.5455/njp>.

SILVA, L.c.r. et al. Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de Cocos nucifera L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória in vivo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.429-434, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000400011>.

SILVA, Mauro; FREITAS, Lucas; SOUZA, Amauri; ARAËJO, Raquel; LACERDA, Inayara; PEREIRA, Hebert; AUGUSTI, Rodinei; MELO, Júlio. Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 1034-1044, 2019. Anual. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190002>.

SILVA, Rafaela Ribeiro et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-88, 16 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-107>.

SIMIRGIOTIS, Mario; QUISPE, Cristina; ARECHE, Carlos; SEPÖLVEDA, Beatriz. Phenolic Compounds in Chilean Mistletoe (Quintral, *Tristerix tetrandus*) Analyzed by UHPLC–Q/Orbitrap/MS/MS and Its Antioxidant Properties. **Molecules**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 245, 23 fev. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21030245>.

SIQUEIRA, Luiz Alberto; ARAGÃO, Wilson Meneses; TUPINAMBÁ, Evandro Almeida. **A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>>. Acesso em: 12 out. 2018.

SOARES, Elaine dos R. *et al.* Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 64-72, 30 dez. 2015. Universidade de Estado do Rio de Janeiro. <http://dx.doi.org/10.12957/rhupe.2015.19942>.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.351-355, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200021>.

SPELMAN, Kevin et al. Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal Immunomodulators. **Alternative Medicine Review**, Greensboro, v. 11, n. 2, p.128-150, dez. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16813462>>. Acesso em: 10 out. 2018.

TEIXEIRA, Marcus Zulian. Fundamentação científica do princípio de cura homeopático na farmacologia moderna. **Revista de Homeopatia**, São Paulo, v. 80, n. 1, p.40-88, 2017. Anual.

TEMGIRE, Mayur Kiran et al. Establishing the interfacial nano-structure and elemental composition of homeopathic medicines based on inorganic salts: a scientific approach. **Homeopathy**, [s.l.], v. 105, n. 2, p.160-172, maio 2016. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2015.09.006>.

TOURNIER, Alexander *et al.* Physicochemical Investigations of Homeopathic Preparations: a systematic review and bibliometric analysis?part 3. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 45-57, 1 jan. 2021. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2020.0243>.

TSITINIDIS, Konstantinos; ALMIRANTIS, Yannis. Ultra-High Dilutions and Homeopathy: can they be explained without non-local theory?. **Homeopathy**, [S.L.], v. 107, n. 03, p. 189-195, 5 jun. 2018. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1656513>.

UPADHYAY, Rohit; RAO, L. Jagan Mohan. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 968-984, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.576319>.

VALADEZ-CARMONA, Lourdes; CORTEZ-GARCÍA, Rosa María; PLAZOLA-JACINTO, Carla Patricia; NECOECHEA-MONDRAGÓN, Hugo; ORTIZ-MORENO, Alicia. Effect of microwave drying and oven drying on the water activity, color, phenolic compounds content and antioxidant activity of coconut husk (*Cocos nucifera* L.). **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 3495-3501, set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-016-2324-7>.

VAN WASSENHOVEN, Michel et al. Nuclear Magnetic Resonance characterization of traditional homeopathically manufactured copper (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls. **Homeopathy**, [s.l.], v. 106, n. 4, p.223-239, nov. 2017. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2017.08.001>.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; MOURA, José Benedito de França; MANFREDINI, Vanusa; BENFATO, Mara da Silveira; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 1323-1338, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000500046>.

VIEIRA, Gilberto Ribeiro. **Homeopatia e Saúde: do reducionismo ao sistêmico**. 2. ed. Belo Horizonte: Do Autor, 2018. 323 p.

VIJU, N.; SATHEESH, S.; VINCENT, S.g.p.. Antibiofilm activity of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk fibre extract. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.85-91, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.002>.

VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, [s.l.], v. 73, n. 1,

p.123-127, fev. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-72992007000100020>.

WIANOWSKA, Dorota; GIL, Marta. Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 273-302, 10 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-018-9592-y>.

WOLF, Ursula; WOLF, Martin; HEUSSER, Peter; THURNEYSEN, André; BAUMGARTNER, Stephan. Homeopathic Preparations of Quartz, Sulfur and Copper Sulfate Assessed by UV-Spectroscopy. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2011, p. 1-11, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep036>.

ZELOVÁ, Hana; HOŠEK, Jan. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 62, n. 7, p. 641-651, 18 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>.

ANEXO 1 – Cromatogramas e espectro da tintura de *Cocos nucifera* botidos por LC-MS

