

ANALISI ESPLORATIVA DELL'EFFETTO DI SOLUZIONI ULTRAMOLECOLARI DI TRIOSSIDO DI ARSENICO SULLO SVILUPPO VEGETATIVO *IN VITRO* DI PLANTULE DI GRANO (*)

M. Brizzi, C. Biondi, L. Lazzarato, L. Betti

1. INTRODUZIONE

Nonostante il crescente interesse dell'opinione pubblica e la rapida espansione del mercato riguardante la medicina omeopatica, la sperimentazione scientifica in questo campo è ancora del tutto insufficiente a dimostrarne (o smentirne) inequivocabilmente la validità.

L'uso di piante per sottoporre a verifica gli effetti dei preparati omeopatici è sicuramente una metodica non convenzionale, che tuttavia consente di ottenere, in tempi relativamente brevi, un'ampia base di dati non condizionati dall'effetto placebo, che nei *trials* clinici costituisce generalmente un problema non secondario. La mancanza o la assoluta insufficienza del supporto informativo e statistico costituisce tradizionalmente uno dei punti deboli di questo settore di ricerca. Uno dei modelli vegetali più utilizzati per questo tipo di sperimentazione è quello costituito dalla germinazione *in vitro* di semi di grano: è stato studiato l'effetto di dosi infinitesimali (ultramolecolari) di vari composti (in prevalenza solfato di rame, nitrato di argento, triossido di arsenico) su semi precedentemente stressati con dosi ponderali dello stesso composto ed è stata notata, in seguito al trattamento, una normalizzazione dei parametri influenzati dall'intossicazione (Pongratz *et al.*, 1998; Betti *et al.*, 1997; Brizzi *et al.*, 1999 e 2000).

Lo scopo principale del presente lavoro è di portare un contributo al problema della definizione delle reali basi scientifiche dell'omeopatia mediante un'analisi statistica esplorativa approfondita, basata su esperimenti randomizzati riproducibili e standardizzati condotti in cieco su una variabile quantitativa continua, quale la lunghezza in cm del germoglio di plantule di grano *in vitro*.

(*) L'articolo è stato ideato, strutturato e discusso congiuntamente dagli Autori; in particolare, si devono a Lucietta Betti e a Lisa Lazzarato la definizione degli aspetti biologici della ricerca e la predisposizione delle condizioni sperimentali dell'esperimento, mentre a Maurizio Brizzi sono da attribuire la scelta delle metodologie statistiche applicate e, insieme a Cristina Biondi, la discussione e l'interpretazione statistica dei risultati. Gli Autori ringraziano inoltre Roberto Nadalutti per l'esecuzione degli esperimenti in laboratorio. La ricerca è stata finanziata dal Gruppo Medico Antroposofico Italiano di Milano.

Inoltre, si è voluto verificare se gli effetti dei due processi di diluizione seriale e di dinamizzazione (succussione meccanica), a cui i preparati omeopatici vengono tradizionalmente sottoposti, possano considerarsi autonomi o sinergici.

2. MATERIALI E METODI

2.1 *Modello biologico*

Le prove sono state effettuate durante l'estate del 1999, utilizzando semi di frumento (*Triticum durum* L.) della varietà MEC, con lo stesso protocollo sperimentale già applicato e descritto (Betti *et al.* 1997; Nadalutti, 2000). I semi venivano posti a vegetare in bustine di plastica a loro volta inserite in buste più grandi di cartoncino opaco, per permettere lo sviluppo del germoglio alla luce e delle radici al buio, a una temperatura controllata (tra 25°C e 27°C), fotoperiodo di 8 ore ed intensità luminosa regolare. La variabile sperimentale presa in considerazione è stata la lunghezza del germoglio, misurata ogni 24 ore, dal secondo al settimo giorno dopo la semina. Le prove sono state condotte in doppio cieco (lo sperimentatore non era a conoscenza del trattamento che stava somministrando di volta in volta, mentre i "pazienti" appartenevano al mondo vegetale), seguendo uno schema randomizzato prefissato.

2.2 *Preparazione e classificazione dei trattamenti*

Il presente studio riprende e sviluppa un esperimento effettuato in precedenza (Betti *et al.*, 1997); analogamente ad esso, i semi di grano sono stati sottoposti ad uno stress preliminare con dosi ponderali di triossido di arsenico (As_2O_3 0,1%) e, successivamente, trattati con una quantità costante (3,2 ml) del trattamento assegnato. La potenza omeopatica considerata è stata la medesima, ossia la *D45*, che comporta 45 fasi di diluizione decimale intervallate da un sistematico processo di dinamizzazione (succussione meccanica verticale, eseguita mediante dinamizzatore automatico). Al trattamento As_2O_3 *D45* sono stati affiancati dei trattamenti parziali costituiti da acqua p.a. Merck dinamizzata *D45* e da As_2O_3 diluito ($1:10^{45}$) senza dinamizzazione. Si sono così definite quattro condizioni sperimentali distinte:

T ₀	Controllo (Acqua p.a. Merck, 90 semi)
T ₁ (H_2O <i>D45</i>)	Acqua dinamizzata (30 semi)
T ₂ (As_2O_3 10^{-45})	Diluizione decimale di As_2O_3 (30 semi)
T ₃ (As_2O_3 <i>D45</i>)	Diluizione decimale e dinamizzazione (30 semi)

2.3 *Metodologia statistica*

La variabile principale presa in considerazione nell'analisi statistica è stata la lunghezza del germoglio delle plantule di grano, misurata quotidianamente a partire dal quarto giorno di osservazione, concludendo la rilevazione al settimo

giorno. I dati, rilevati al termine del periodo di osservazione, sono stati sottoposti a una descrizione statistica accurata, evidenziando in particolare la differenza tra i tre trattamenti sperimentali applicati ed il controllo. Poiché la distribuzione osservata della variabile, in tutti i campioni individuati, si è rivelata marcatamente asimmetrica, non è stato possibile applicare i classici test parametrici (confronto tra due medie, analisi della varianza), neppure ricorrendo ai logaritmi; sono state quindi utilizzate tecniche non parametriche basate sui ranghi, ossia sulle posizioni occupate dai dati osservati in una graduatoria crescente. In particolare, sono stati applicati il test di Wilcoxon-Mann-Whitney per il confronto di due campioni indipendenti e il test della somma dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati, per eseguire il quale si sono scelti due criteri di accoppiamento basati sulla cograduazione. Per quanto riguarda la frequenza di plantule completamente germinate (ossia con lunghezza del germoglio non inferiore a 3 cm), è stato applicato il classico test binomiale (con approssimazione normale) per il confronto tra due frequenze. Infine, l'andamento medio giornaliero della crescita del germoglio è stato confrontato con l'analogo esperimento effettuato in precedenza e descritto in Betti *et al.* (1997).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Come evidenziato nel titolo, la metodologia applicata è prevalentemente di tipo esplorativo, e i dati rilevati sono stati analizzati e confrontati mediante rappresentazioni, grafiche e tabellari, corredate dal calcolo di alcune costanti caratteristiche fondamentali, relative ai quattro campioni ottenuti, che sono state illustrate nella Tabella 1.

Leggendo la tabella, si può anzitutto notare come la lunghezza media del germoglio sia sensibilmente maggiore nei soggetti trattati rispetto ai controlli. In particolare, il trattamento T_3 (diluizione e dinamizzazione) è risultato il più favorevole alla crescita, avendo registrato una lunghezza media superiore del 21,5% rispetto al gruppo di controllo, confermando i risultati dell'esperimento precedente, nel corso del quale la differenza, sempre a favore dei trattati, era stata del 24,0% (Betti *et al.*, 1997). La variabilità di ciascun campione è stata misurata con lo scostamento semplice medio dalla mediana (indicato con S_{Me}) e con lo scarto quadratico medio. I gruppi con la variabilità maggiore risultano T_0 e T_2 , ossia quelli non sottoposti a dinamizzazione. L'indice di asimmetria indicato nella tabella è il "classico" indice γ di Pearson, basato sui momenti di terzo ordine. Si evidenzia una marcata asimmetria negativa per tutti i gruppi sperimentali, più rilevante nei gruppi T_1 e T_3 , ossia nei trattamenti in cui viene applicata la dinamizzazione. Pertanto, il processo di succussione meccanica previsto nei protocolli omeopatici sembra ridurre la variabilità e aumentare l'asimmetria.

Confrontando i quartili corrispondenti, ci si accorge che la differenza tra controlli e trattati è dovuta soprattutto alle osservazioni di coda sinistra, ossia le più piccole. Per visualizzare meglio questa differenza è stata costruita, per ciascun trattamento, la funzione di graduazione, ossia l'inversa della funzione di riparti-

TABELLA 1

Descrizione statistica dei dati relativi alla variabile sperimentale (lunghezza del germoglio in cm), corrispondenti a ciascuno dei trattamenti considerati

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
N. di osservazioni	90	30	30	30
Media campionaria	6,18	7,23	6,84	7,51
Media (controllo = 100)	100,0	117,0	110,7	121,5
1° quartile	3,05	6,85	2,25	6,35
Mediana	7,28	8,08	8,35	8,00
3° quartile	8,60	8,90	10,40	9,30
Scostamento medio dalla mediana	2,92	2,04	3,60	1,79
Scarto campionario	3,63	3,07	4,37	2,57
Asimmetria (indice g)	-0,47	-1,34	-0,58	-1,50

zione, rappresentata nella Figura 1: in ascissa sono indicati i centili, in ordinata i valori corrispondenti. Osservando il grafico, si nota come la curva relativa al trattamento T₃ e, in misura minore, quella corrispondente trattamento T₁, siano più elevate in corrispondenza dei centili inferiori, mentre le curve raggiungono livelli molto più ravvicinati nella parte finale.

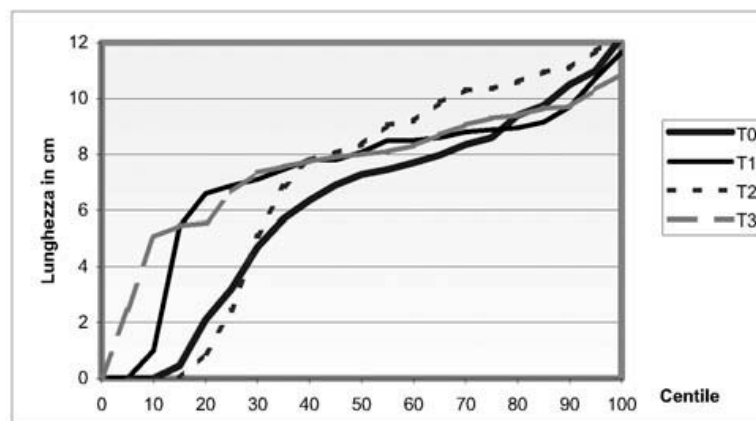


Figura 1 – Distribuzione empirica della lunghezza del germoglio per trattamento.

Si è poi deciso di valutare la significatività delle differenze riscontrate, cercando di applicare il test più opportuno. I valori dell'indice di asimmetria γ , evidenziati nell'ultima riga della tabella 1, non permettono di ipotizzare la simmetria, e tantomeno la normalità distributiva, delle popolazioni sottostanti e non è stato possibile applicare una trasformazione di tipo logaritmico, in quanto i campioni rilevati presentavano numerose osservazioni uguali a zero, come risulta dalla successiva tabella 4. Pertanto, la differenza tra i livelli medi dei due gruppi (T₃ e T₀) è stata statisticamente controllata tramite procedure inferenziali non parametriche. Si è anzitutto applicato il test di Wilcoxon-Mann-Whitney per due campioni indipendenti; poiché le numerosità dei due campioni sono sufficientemente elevate, si è fatto ricorso all'approssimazione normale con correzione di continuità. Ciascuno dei tre campioni sperimentali è stato confrontato con il campione di controllo.

Nel confronto tra il controllo e il trattamento T₃, quello in cui si sono manifestati i risultati più evidenti (come si può osservare confrontando la lunghezza

media del germoglio), il valore della statistica test è risultato pari a 1,652: tale valore risulta significativo al 5% considerando il test a una coda. Anche il trattamento T_1 , di sola dinamizzazione, dà luogo a una lunghezza media più elevata rispetto al controllo; tuttavia, per il gruppo T_1 , la differenza è meno rilevante, e con il medesimo test il confronto rispetto al gruppo T_0 non risulta significativo.

Rimanendo in ambito non parametrico, per saggiare ipotesi analoghe, esiste un test più potente rispetto al precedente, e precisamente il test di Wilcoxon per campioni dipendenti, mediante il quale si fa un confronto per differenza tra le osservazioni opportunamente appaiate, una per campione, e si attribuiscono i ranghi non direttamente alle osservazioni, bensì alle differenze tra le osservazioni di ciascuna coppia. La potenza-efficienza del test di Wilcoxon per dati dipendenti è stata quantificata ed evidenziata in numerosi lavori didattici e scientifici (Siegel, 1992; Gibbons e Chakraborti, 1992); rispetto al test t di Student, ove applicabile, l'efficienza relativa asintotica è circa pari a $3/\pi$ (circa 0,955), e si avvicina a 0,95 anche per campioni di dimensioni modeste.

Uno dei problemi principali da risolvere, per poter applicare validamente il test di Wilcoxon, consiste nel definire un criterio di appaiamento che non sia puramente convenzionale. Nella presente ricerca si è scelto di abbinare le osservazioni in base a criteri di cograduazione. Si sono percorse due strade diverse. Per prima cosa, si è pensato di considerare, per ciascun campione, un insieme di 19 centili determinati seguendo un passo fisso pari a 5 (il 5° centile, il 10°, il 15°, ..., fino al 95°). Il test è stato quindi applicato confrontando i centili omologhi dei due campioni di volta in volta esaminati. Nella seguente tabella sono illustrati i risultati così ottenuti:

TABELLA 2

Risultati del test di Wilcoxon applicato ai centili.

Confronto	N	T+	T-	Valore p
$T_1 - T_0$	18	153	18	0,16%
$T_2 - T_0$	17	136	17	0,25%
$T_3 - T_0$	18	157	14	0,10%
$T_3 - T_1$	18	112	59	N.S.
$T_3 - T_2$	19	103	87	N.S.
$T_2 - T_1$	17	87	73	N.S.

Come si può notare, il test di Wilcoxon rivela una differenza altamente significativa tra ciascun trattamento ed il controllo, ad un livello di significatività nettamente inferiore all'1% (valore p compreso tra 1 e 2,5 per mille); viceversa, confrontando i trattamenti a due a due, non si evidenziano differenze significative. Tra i tre trattamenti sperimentali, quello che si è distanziato maggiormente rispetto al controllo è stato il trattamento "completo" T_3 (diluizione e dinamizzazione).

Successivamente, per cercare di utilizzare ancora maggiormente l'informazione proveniente dai campioni sperimentali, si è pensato di modificare la tecnica di appaiamento delle osservazioni nel modo seguente. Le 90 osservazioni del campione di controllo sono state poste in ordine crescente e suddivise in 30 piccoli gruppi di tre dati ciascuno; le medie aritmetiche dei 30 gruppi ottenuti formano così un nuovo campione ordinato della stessa numerosità dei campioni sperimentali T_1 , T_2 e T_3 . Il test di Wilcoxon è stato

quindi applicato confrontando le osservazioni cograduate dei due campioni via via considerati. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.

TABELLA 3

Risultati del test di Wilcoxon applicato considerando, nel il campione di controllo, le medie dei piccoli gruppi

Confronto	n	T+	T-	Valore p
T ₁ -T ₀	27	337	41	0,03%
T ₂ -T ₀	26	287,5	63,5	0,23%
T ₃ -T ₀	28	361	45	0,03%
T ₃ -T ₁	25	187,5	137,5	N.S.
T ₃ -T ₂	28	210	196	N.S.
T ₂ -T ₁	26	188	163	N.S.

Applicando il test alle osservazioni cograduate e, per il campione di controllo, alle medie dei piccoli gruppi, si sono ottenuti risultati abbastanza simili; il valore p , per i trattamenti T_1 e T_3 è risultato ancora una volta inferiore rispetto al test effettuato sui centili.

TABELLA 4

Classificazione dei semi in base al livello di germinazione

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
Non germinati	14 (15,6%)	3 (10,0%)	6 (20,0%)	2 (6,7%)
Parzialmente (< 3 cm.)	8 (8,9%)	1 (3,3%)	3 (10,0%)	0 (0,0%)
Completamente (> 3 cm.)	68 (75,6%)	26 (86,7%)	21 (70,0%)	28 (93,3%)

Si è altresì osservato che la frequenza dei semi non completamente germinati è ben differenziata tra i gruppi sperimentali, come si evince dalla tabella 4. Considerando la frequenza dei semi *completamente* germinati, ed effettuando il “classico” test per il confronto tra due frequenze con approssimazione normale (la dimensione campionaria è sufficientemente grande) tra il campione T_3 (As_2O_3 D45) e il campione di controllo, si è riscontrato un valore $z = 2,099$ che, considerando il test a una coda, risulta significativo ad un livello inferiore al 2%.

TABELLA 5

Andamento giornaliero della lunghezza media del germoglio (in cm) nei due esperimenti

Giorni	Esperimento precedente (inverno 1993/94)			Esperimento attuale (estate 1999)		
	T0	T3	Diff. %	T0	T3	Diff. %
4	0,82	0,93	13,4%	1,82	2,23	22,5%
5	1,49	1,77	19,4%	3,24	3,85	18,8%
6	2,26	2,76	22,0%	4,85	5,69	17,3%
7	3,17	3,94	24,0%	6,18	7,51	21,5%

Infine, nella tabella 5 è rappresentato l'andamento medio giornaliero della crescita del germoglio per i gruppi T_0 e T_3 , a partire dal quarto giorno di osservazione. I dati sono confrontati con gli analoghi risultati dell'esperimento precedente (Betti *et al.*, 1997); si può notare, nonostante l'ordine medio di grandezza sia diverso, una sostanziale ripetizione dei risultati ottenuti nel primo esperimento in termini di differenza percentuale tra le lunghezze medie dei germogli “trattati” (T_3) e dei “controlli” (T_0).

4. CONCLUSIONI

I risultati evidenziano un effetto significativo dei trattamenti T_1 , T_2 e T_3 rispetto al controllo T_0 , particolarmente evidente per il trattamento T_3 ; ciò sembra confermare l'effetto stimolante di As_2O_3 D45 sulla germinazione dei semi e sulla crescita dei germogli di grano, già rilevato nelle ricerche precedenti (Betti *et al.*, 1994 e 1997; Brizzi *et al.*, 2000), anche se la ricerca non può dirsi conclusiva e va ulteriormente approfondita. Confrontando, in particolare, i risultati sopra descritti con quelli dell'analogo esperimento del 1997, si può notare come lo sviluppo del germoglio mostri lo stesso *trend* di crescita, pur raggiungendo livelli assai differenti di lunghezza complessiva, anche a causa del diverso periodo stagionale in cui le due prove sono state effettuate (inverno ed estate). Il confronto tra i trattamenti applicati permette inoltre di sottolineare l'importanza del processo di dinamizzazione: in tutti i lavori citati, infatti, il trattamento di sola dinamizzazione (T_1) ha dato risultati più rilevanti rispetto al trattamento di sola diluizione (T_2), anche se gli effetti congiunti (T_3) sono i più evidenti. I risultati del presente studio confermano questa regola: la lunghezza media del germoglio, rispetto al campione di controllo, è stata superiore del 21,5% per il trattamento "completo" As_2O_3 D45 (T_3), del 17% per il trattamento di sola dinamizzazione e, infine, del 10,7% per il trattamento di sola diluizione. Tuttavia, pur avendo ottenuto risultati univoci e ripetuti, riteniamo che la ricerca in questo settore vada ulteriormente approfondita e dotata di una sempre maggiore evidenza scientifica e statistica. Riguardo alla metodologia statistica, va evidenziata l'utilità dei test non parametrici in questi contesti, in cui è difficilmente proponibile l'ipotesi di normalità distributiva della popolazione, essendo i dati campionari palesemente asimmetrici. Potrebbe essere interessante individuare un modello distributivo che possa rappresentare adeguatamente l'andamento della lunghezza del germoglio (la distribuzione Gamma potrebbe essere un modello adeguato), in modo da poter utilizzare al meglio l'informazione sperimentale; ma per seguire questa strada ci sarà bisogno di un'evidenza campionaria più consistente. Il gruppo di lavoro sta già procedendo in questa direzione, con esperimenti nuovi e maggiormente dettagliati, per risultati dei quali si rimanda a contributi futuri.

Dipartimento di Scienze statistiche "Paolo Fortunati"
Università di Bologna

MAURIZIO BRIZZI
CRISTINA BIONDI

Dipartimento di Scienze e tecnologie agro-ambientali
Università di Bologna

LISA LAZZARATO
LUCIETTA BETTI

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- L. BETTI, M. BRIZZI, D. NANI, M. PERUZZI (1994), *A pilot statistical study with homeopathic potencies of Arsenicum album in wheat germination as a simple model*. "British Homeopathic Journal", 83, pp. 195-201.

- L. BETTI, M. BRIZZI D. NANI, M. PERUZZI (1997), *Effect of high dilutions of Arsenicum album on wheat seedlings from seed poisoned with the same substance*. "British Homeopathic Journal", 86, pp. 86-89.
- M. BRIZZI, L. BETTI (1999), *Using statistics for evaluating the effectiveness of homeopathy. Analysis of a large collection of data from simple plant models*. III Congresso Nazionale della Società Italiana di Biometria, Roma 7-9 luglio 1999, Abstract book, pp. 74-76.
- M. BRIZZI, D. NANI, M. PERUZZI, L. BETTI (2000), *A statistical contribution to the problem of homeopathy effectiveness based on a large data collection from a wheat germination model*. "British Homeopathic Journal", 89, pp. 63-67.
- J.D. GIBBONS, S. CHAKRABORTI (1992), *Nonparametric statistical inference*, Marcel Dekker, New York.
- R. NADALUTTI (2000), *Studio dell'effetto biologico di diluizioni omeopatiche di Arsenicum album su germogli di grano*. Tesi di laurea, Facoltà di Farmacia, Università di Bologna, a.a. 1999/2000.
- W. PONGRATZ, A. NOGRASEK, C. ENDLER (1998), *Highly diluted agitated silver nitrate and wheat seedling development. Effects kinetics of a process of successive agitation phases*. In "Fundamental research in ultra high dilution and homeopathy.", a cura di J. Schulte e P.C. Endler. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL), pp. 143-154.
- S. SIEGEL, N.J. CASTELLAN (1992), *Statistica non parametrica*, a cura di Ettore Caracciolo, Mc Graw-Hill Italia, Milano.

RIASSUNTO

Analisi esplorativa dell'effetto di soluzioni ultramolecolari di triossido di arsenico sullo sviluppo vegetativo in vitro di plantule di grano

Il presente studio descrive i risultati di un esperimento nel corso del quale alcuni semi di grano venivano intossicati con una dose ponderale di triossido di arsenico (As_2O_3), e successivamente trattati con diluizioni ultramolecolari della medesima sostanza, con e senza dinamizzazione del preparato. La variabile sperimentale considerata è la lunghezza del germoglio dopo 7 giorni di trattamento; è stata fornita un'accurata descrizione statistica, sia analitica che grafica, dei risultati. Sono stati applicati alcuni test non parametrici per eseguire un confronto tra i campioni trattati e il campione di controllo: la 45^a potenza decimale evidenzia un effetto stimolante sulla lunghezza del germoglio, riproducendo sostanzialmente il risultato già ottenuto in un analogo esperimento (Betti *et al.*, 1997), evidenziando un grado soddisfacente di ripetibilità per il modello utilizzato.

SUMMARY

Exploratory analysis of the effects of ultra-molecular arsenic trioxide on wheat seedling growth in vitro

This paper deals with an experiment in which wheat seeds were stressed with a material dose of As_2O_3 , and then treated with ultra-molecular dilutions of the same substance, with and without potentization. We focused our analysis on seedling stem length during 7 days of treatment, and tried to give a thorough statistical description of the data. We applied simple nonparametric tests for comparing treated and control groups: it seems to be a significant stimulating effect when seeds are treated with the 45th decimal potency of As_2O_3 . A similar effect was obtained in a previous experiment (Betti *et al.*, 1997), and shows that our model allows a proper reproducibility of results.