

UNIVERSIDADE PAULISTA

CAMILA LONGHI MACARRÃO

**EFEITOS DA ÁGUA DO MAR DESSALINIZADA, PURIFICADA E POTÁVEL EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

SÃO PAULO

2015

CAMILA LONGHI MACARRÃO

**EFEITOS DA ÁGUA DO MAR DESSALINIZADA, PURIFICADA E POTÁVEL EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Dissertação para obtenção do título de mestre
em Patologia Ambiental e Experimental
apresentado à Universidade Paulista – UNIP

Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Jamli Abel

SÃO PAULO
2015

Macarrão, Camila Longhi.
Efeitos da água do mar dessalinizada, purificada e potável em
sistemas biológicos / Camila Longhi Macarrão. - 2015.
46 f. : il.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista, São Paulo, 2015.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Jamli Abel.

CAMILA LONGHI MACARRÃO

**EFEITOS DA ÁGUA DO MAR DESSALINIZADA, PURIFICADA E POTÁVEL EM
SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Dissertação para obtenção do título de mestre
em Patologia Ambiental e Experimental
apresentado à Universidade Paulista – UNIP

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____	/	____	/	____
Prof. Dr. Mario Mariano				
Universidade Paulista - UNIP				
_____	/	____	/	____
Prof. ^a Dr. ^a Leoni Villano Bonamin				
Universidade Paulista - UNIP				
_____	/	____	/	____
Prof. ^a Dr. ^a Lucia Jamli Abel				
Universidade Paulista - UNIP				

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao meu noivo, que me auxiliou em todos os momentos.

E, especialmente, ao meu Nonno, pois sem ele não teria a oportunidade de participar de um trabalho tão importante.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus todas as oportunidades de crescimento físico, mental e espiritual.

Agradeço aos meus pais e ao meu noivo que sempre estiveram ao meu lado durante toda a jornada.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Lucia Jamli Abel a orientação e condução do trabalho em todas as etapas, sua orientação foi valiosa para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Leoni Bonamin a colaboração e as análises histológicas realizadas para este trabalho.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Melissa Rodrigues de Lara a colaboração e participação neste projeto.

RESUMO

Dados da ONU, de 2014, preveem que em 2025 mais de metade da população mundial não terá acesso à água potável. De toda a água disponível na Terra, 97,2% é concentrada nos oceanos e apenas 0,02% está disponível em rios e lagos, sob a forma de água doce para consumo. Hoje, é possível coletar a água do mar e torná-la potável, por meio de tecnologia já disponível em vários países do Oriente Médio e Norte da África, onde a água doce de rios, lagos e reservatórios é escassa. O processo de dessalinização da água não é usado em larga escala no Brasil, dados os enormes recursos hídricos do país. Comparativamente, as águas minerais oferecem, em média, cerca de 12 minerais, enquanto a água dessalinizada e nanofiltrada do mar, tema deste estudo, oferece 63 minerais, que são importantes para a função celular adequada. Baseado nessa evidência, este projeto resulta da investigação dos possíveis efeitos da água do mar para as células e funções celulares e a saúde, em geral, utilizando modelos experimentais *in vitro*.

Palavras-chave: Água do mar. Nanotecnologia. Viabilidade celular. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

2014 ONU data reveal that by 2025 over half of world population will not have access to clean water. Of all the water available on earth 97.2% is concentrated in the oceans and only 0.02% is available from rivers and lakes in the form of fresh water for consumption. Today it is possible to remove the sea water and make it drinkable and this technology already occurs in several countries in the Middle East and North Africa where freshwater rivers, lakes and reservoirs is scarce. The process of water desalination is not done on a large scale in Brazil, given the vast water resources of the country. Mineral waters, mostly offer on average, about 12 minerals, while the desalinated and nanofiltrated water from sea that will be used in this study offers 63 minerals, important for proper cell function. Thus, this design results in the investigation of the possible effects of the sea water to cells and cellular functions and overall health using experimental models in vitro.

Keywords: Seawater. Nanotechnology. Cell survival. Acute toxicity.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Gráficos

Gráfico 1 – Viabilidade (%) de células de fibroblasto 3T3 através do corante azul de tripan. Células de fibroblasto 3T3 cultivadas na presença de meio RPMI 10% SFB preparado com água convencional (A); células de fibroblasto 3T3 na presença de meio preparado com água do mar dessalinizada (B); com a adição da água do mar dessalinizada com 25% FCS (C); com a adição da água do mar dessalinizada com 50% SFB (D); com a adição da água do mar dessalinizada com 75% SFB; (E) com a adição da água do mar dessalinizada sem soro (F).	19
Gráfico 2 – Viabilidade celular pelo método MTT. Células de fibroblasto 3T3 cultivadas na presença de meio RPMI preparado com água convencional 10% (A); na presença de RPMI preparado com água do mar dessalinizada 10% SFB (B); na presença da água convencional sem soro (C); na presença da água convencional com 10% SFB (D); na presença da água do mar dessalinizada sem soro (E); na presença da água do mar dessalinizada 10% SFB.	20
Gráfico 3 – Proliferação celular pelo método MTT de células da linhagem B16 proveniente de melanoma murino e com a linhagem de fibroblasto normal 3T3-NIH cultivadas na presença de RPMI 10% SFB.	20
Gráfico 4 – Comparativo: Leucócitos água exp. e cont. teste agudo.....	22
Gráfico 5 – Comparativo: Neutrófilos água exp. e cont. teste agudo.....	22
Gráfico 6 – Comparativo: Linfócitos água exp. e cont. teste agudo.	23
Gráfico 7 – Comparativo: Monócitos água exp. e cont. teste agudo.	23
Gráfico 8 – Comparativo: Eosinófilos água exp. e cont. teste agudo.	23
Gráfico 9 – Comparativo: Hemácias água exp. e cont. teste agudo.	23
Gráfico 10 – Comparativo: Ureia água exp. e cont. teste agudo.....	24
Gráfico 11 – Comparativo: Creatinina água exp. e cont. teste agudo.....	24
Gráfico 12 – Comparativo: ALT água exp. e cont. teste agudo.....	24
Gráfico 13 – Comparativo: AST água exp. e cont. teste agudo.....	24
Gráfico 14 – Comparativo: Glicose água exp. e cont. teste agudo.....	24
Gráfico 15 – Comparativo: Função renal água exp. e cont. teste agudo.....	26
Gráfico 16 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase jovem).	26
Gráfico 17 – Comparativo: Hemácias, teste crônico (fase jovem).....	26
Gráfico 18 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase jovem).	27
Gráfico 19 – Comparativo: Ht, teste crônico (fase jovem).	27
Gráfico 20 – Comparativo: Plaquetas, teste crônico (fase jovem).	27
Gráfico 21 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase jovem).....	27
Gráfico 22 – Comparativo: Linfócitos (NK), teste crônico (fase jovem).....	27
Gráfico 23 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase jovem).	27
Gráfico 24 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase jovem).	28
Gráfico 25 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase jovem).....	28
Gráfico 26 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase jovem).	28
Gráfico 27 – Comparativo: AST, teste crônico (fase jovem).	28
Gráfico 28 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase jovem).....	28
Gráfico 29 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase jovem).....	28
Gráfico 30 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase jovem).....	29
Gráfico 31 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase adulta).....	30
Gráfico 32 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase adulta).	30
Gráfico 33 – Comparativo: Hemoglobina, teste crônico (fase adulta).	31

Gráfico 34 – Comparativo: Hematócrito, teste crônico (fase adulta).....	31
Gráfico 35 – Comparativo: Plaquetas, teste crônico (fase adulta).	31
Gráfico 36 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase adulta).	31
Gráfico 37 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase adulta).....	31
Gráfico 38 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase adulta).....	31
Gráfico 39 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase adulta).....	32
Gráfico 40 – Comparativo: AST, teste crônico (fase adulta).	32
Gráfico 41 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase adulta).	32
Gráfico 42 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase adulta).	32
Gráfico 43 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase adulta).	32
Gráfico 44 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase adulta).	33
Gráfico 45 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase senil).....	34
Gráfico 46 – Comparativo: Hematócrito, teste crônico (fase senil).	34
Gráfico 47 – Comparativo: Hemoglobina, teste crônico (fase senil).	35
Gráfico 48 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase senil).....	35
Gráfico 49 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase senil).....	35
Gráfico 50 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase senil).	35
Gráfico 51 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase senil).	35
Gráfico 52 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase senil).....	35
Gráfico 53 – Comparativo: AST, teste crônico (fase senil).....	36
Gráfico 54 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase senil).	36
Gráfico 55 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase senil).	36
Gráfico 56 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase senil).	36
Gráfico 57 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase senil).	36
Gráfico 58 – Comparativo: Insulina, teste crônico (fase senil).	36
Gráfico 59 – Comparativo: Corticosterona, teste crônico (fase senil).....	37
Gráfico 60 – Comparativo: Cálcio, teste crônico (fase senil).	37

Figuras

Figura 1 – As linhagens de células THP-1 foram incubadas com RPMI 10% SFB na presença de água convencional (A) e na presença da água do mar dessalinizada (B). As células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 FITC, MHC classe II PE (BD Biosciences). As células foram processadas por citometria FACS flow (Becton Dickinson, San Jose, CA) e analisadas com <i>software</i> (Beckton Dickinson). Linfócitos foram localizados de acordo com o tamanho e número (10,00-30,000) e as células analisadas.....	21
Figura 2 – Níveis de apoptose de células THP-1 em meio de cultura RPMI com água convencional (A) e água do mar dessalinizada (B). Apoptose foi analisada por citometria bidimensional utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI), de acordo com instruções do fabricante (Biotest). Os eventos se acumularam na parte superior e abaixo no quadrante direito simulando células em apoptose.....	22
Figura 3 – Padrão histológico de pulmão e fígado, respectivamente, de camundongos do grupo experimental.	25
Figura 4 – Análise das características histológicas dos rins de camundongos Balb-c, utilizando-se escores, após indução de toxicidade aguda por doses repetidas, classificando-se de 0 a 3 o nível de alteração (H.E.10X).....	25
Figura 5 – Padrão histológico de pulmão de ratos Wistar do grupo experimental (H.E.10X).	29
Figura 6 – Padrão histológico de fígado (A) e bexiga (B) de ratos Wistar do grupo experimental (H.E.10X).....	30

Figura 7 – Padrão histológico de pulmão (A) e rim (B) de ratos Wistar adultos do grupo experimental (H.E.10X)..... 33

Figura 8 – Padrão histológico de fígado (A) e bexiga (B) de ratos Wistar adultos do grupo experimental (H.E.10X). 34

SUMÁRIO

Introdução.....	13
Materiais e métodos	16
1. Água do mar dessalinizada potável.....	16
1.1 Análise da água do mar potável dessalinizada.....	16
2. Análise <i>in vitro</i>	16
3. Análise <i>in vivo</i>	17
3.1 Toxicidade aguda por doses repetidas.....	17
4. Avaliação da toxicidade crônica com uso prolongado	18
5. Análise estatística.....	18
Resultados	19
1. Análise <i>in vitro</i>	19
2. Análise <i>in vivo</i> – toxicidade aguda	22
3. Análise <i>in vivo</i> – toxicidade crônica.....	26
3.1 Análise hematológica	26
3.2 Análise bioquímica	28
3.3 Análise histológica.....	29
3.4 Análise hematológica	30
3.5 Análise bioquímica	32
3.6 Análise histológica.....	33
3.7 Análise hematológica	34
3.8 Análise bioquímica	36
Discussão.....	37
Conclusão	43
Referências	44

Introdução

A busca por alternativas para a obtenção de água potável está se tornando cada vez mais frequente na época atual. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025, metade da população mundial estará vivendo em áreas com escassez de água, elemento essencial para a saúde humana, a homeostase celular e a vida, em geral (POPKIN et al., 2011; The National Academies Press, 2005). Como principal constituinte do nosso corpo, a água compreende 75% do peso corporal em crianças e 55% nos idosos. Sem água, um ser humano pode sobreviver apenas por um dia, em média (POPKIN et al., 2011; JEQUIER et al., 2010). A ingestão adequada (AI) de água para homens e mulheres jovens (idades entre 19 e 30 anos) é de 3,7 L e 2,7 L por dia, respectivamente (The National Academies Press, 2005). A água é um componente multifuncional do corpo humano, responsável por agir como um transportador de nutrientes, lubrificante e amortecedor, solvente, reagente e produto de reações, atuando também na regulação térmica (JEQUIER et al., 2010).

Diariamente, na dieta convencional, podemos não consumir a quantidade necessária de todos os minerais, oligoelementos que são importantes para o bom funcionamento do organismo, no balanço mineral e homeostase celular. Dado que estas substâncias não podem ser produzidas pelo próprio corpo, há dependência direta da dieta. A ingestão inadequada desses micronutrientes pode, potencialmente, levar a estados de deficiência nutricional e diversas manifestações patológicas conhecidas, derivadas dessas deficiências (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 1997).

A água do mar profunda detém uma imensa quantidade de minerais essenciais para a saúde, que podem agir em muitos processos do organismo. Sugere-se, inclusive, que a água do mar contém a fonte primordial de componentes químicos que contribuíram para a criação da vida (SOYOUNG et al., 2013). Além dos principais minerais, mais de 70 oligoelementos existentes na água do oceano já foram documentados (HOU et al., 2013). Alguns investigadores do Japão e da Europa revelaram os benefícios e as propriedades terapêuticas da água do mar dessalinizada no tratamento de várias doenças, como câncer disseminado (KIM et

al., 2013), eczema (HATAGUCHI et al., 2005), rinite alérgica (KIMATA et al., 2001), hipertensão arterial (SHEU et al., 2013), diabetes (HA et al., 2013), aterosclerose (MIYAMURA et al., 2013), recuperação da osteoporose (LIU et al., 2013), entre outras. Na Colômbia, a água do mar é utilizada como suplemento alimentar desde 2001 (SOLER et al., 2006)

A descoberta mais surpreendente refere-se ao fato de a água do mar conter todos os tipos de minerais e elementos essenciais para a vida celular, comparável ao plasma sanguíneo na proporção de sais, contendo ainda microrganismos ligados organicamente e componentes prebióticos que aumentam a sua biodisponibilidade para o transporte intestinal (BERNARDO et al., 2003).

A combinação criativa de velhas e novas tecnologias pode melhorar a qualidade e a abundância de água potável no mundo, de acordo com um artigo publicado pela revista científica britânica *Nature* (PORTER et al., 2009). Pesquisadores das principais universidades americanas avaliaram áreas relativamente novas da ciência, como a nanofiltragem e a osmose reversa, por sua capacidade de eliminar o risco de doenças transmissíveis pela água e, assim, tornar o mar um grande reservatório de água para o consumo humano.

Hoje, é possível remover o sal da água do mar e torná-la potável, processo já existe em muitos países onde a água doce de rios e lagos é escassa. A dessalinização não é uma ideia nova, sendo utilizada em muitas regiões, especialmente no Oriente Médio. A Arábia Saudita, por exemplo, sozinha, responde por cerca de um décimo da dessalinização global, enquanto Israel usa a tecnologia de dessalinização para atender cerca de um quarto das suas necessidades de água doméstica (SOUZA, 2006). Entre as técnicas de dessalinização, a mais bem-sucedida é chamada de osmose reversa, que separa o líquido por alta pressão através de uma membrana semipermeável, que retém os sais e permite a passagem da água (SOUZA, 2006; RILEY et al., 2011).

O processo de dessalinização da água não é feito em grande escala no Brasil, dados aos enormes recursos hídricos do país. No entanto, em algumas cidades do nordeste, mais de 1.500 comunidades dependem deste processo para obter água potável no semiárido (SOUZA, 2006). O abastecimento de Fernando de Noronha também só é possível com o uso de purificadores de água do mar.

A água do mar profunda é definida como a água do mar colhida a uma profundidade de mais de 200 metros. Essa água é rica em minerais como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na) e zinco (FU et al., 2012; HWANG et al., 2009; KIM et al., 2013; LI et al., 2014; MIYAMURA et al., 2013). Tem sido amplamente utilizada nos campos de aquacultura, agricultura, processamento de alimentos e cosméticos (KIM et al., 2013). Mais recentemente, a comunidade científica começou a estabelecer os benefícios à saúde relacionados à água do mar profunda, no entanto, esses estudos ainda são preliminares e aplicações desse tipo de água em campos médicos exigem mais evidências científicas de suas atividades biológicas (HATAGUCHI et al., 2005).

Assim, este projeto resulta na investigação dos efeitos da água do mar dessalinizada, purificada e potável, verificando se há ou não alterações celulares por diferentes mecanismos e ação no metabolismo e função de células *in vitro* e se existe algum tipo de toxicidade aguda em camundongos.

Materiais e métodos

1. Água do mar dessalinizada potável

A água utilizada foi a 63 Mineral Water® colhida em alto-mar, 30 metros adentro da costa e a 30 metros de profundidade, filtrada e purificada pelo processo de osmose reversa modificada, que, segundo o fabricante, mantém 63 minerais, que são selecionados durante o processo. Todo sal e impurezas foram retirados da água, permanecendo apenas os minerais e nutrientes naturais, sem nenhuma substância acrescentada em qualquer das etapas de produção.

1.1 Análise da água do mar potável dessalinizada

- **pH** – 7,3
- **Dureza total** (mg CaCO₃/l) – 5,27 ± 0,00
- **Matéria orgânica** (mg O₂/l) – 0,00 ± 0,00
- **Nitrogênio amoniacal** – Negativo
- **Sólidos totais** (g/100 g) – 0,65 ± 3,46
- **Nitrato expresso em nitrito** (mg/L) MAA – <5
- **Nitrito** (mg/L) MAA – 0,00 ± 0,00
- **Coliformes totais** (em 100 mL) – Ausente
- ***Escherichia coli*** (em 100 mL) – Ausente
- **Contagem total de aeróbicos mesófilos** (UFC/mL)* – 2,3 x 10³

2. Análise *in vitro*

Verificamos os efeitos da água do mar dessalinizada sobre uma cultura de células de fibroblasto da linhagem NIH-3T3 através de análise microscópica. Células de fibroblasto foram cultivadas de duas formas, ambas em meio de cultura RPMI contendo 10% SFB (soro fetal bovino), um meio com água convencional, o outro com água do mar dessalinizada. A viabilidade celular foi analisada com o corante azul de tripan, através de exame microscópico das células.

A proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT 3-(4,5 dimetilazol-2yl-2-5-difenil bromo tetrazolato 2H). A partir do resultado da resposta proliferativa na presença de água do mar dessalinizada, foi também avaliada a capacidade de proliferação com a linhagem melanoma murino B16, em comparação com a linha de fibroblastos NIH-3T3 normais cultivados na presença de meio RPMI 10% SFB.

Devido à presença de minerais e nutrientes na água do mar dessalinizada, foi investigada sua ação nas células do sistema imunitário através da expressão de CD4 e MHC de classe II em linhagens de células T humanas. O efeito da água na incidência de apoptose foi analisada por citometria de fluxo bidimensional (FACS) utilizando marcação da anexina V e PI, de acordo com as instruções do fabricante. Células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI.

3. Análise *in vivo*

3.1 Toxicidade aguda por doses repetidas

Foram utilizados 36 camundongos Balb-c com 60 dias, divididos em dois grupos: **grupo controle**: n = 18 animais que receberam água mineral Arrowhead e **grupo experimental**: n = 18 animais que receberam água do mar dessalinizada, os quais foram alojados em gaiolas de polipropileno de 32 X 32 X 16 cm, forradas com maravalha. As caixas foram mantidas em unidades isoladas com aeração, exaustão, temperatura de 20 ± 2 °C controlada por sistema de ar condicionado. A água e a ração serão fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental.

A avaliação de toxicidade aguda por doses repetidas foi realizada de acordo com o protocolo descrito em WHO, 1992, com adaptações. Os 18 animais do grupo experimental receberam água do mar dessalinizada, e os 18 animais do grupo controle receberam água mineral controle (Arrowhead) por via oral através de cânulas de aço inoxidável (gavagem) em um volume de 0,5 mL em 8 doses com intervalo de 1 hora entre as doses. Após a administração, os animais foram observados por 24 horas e avaliados quanto ao peso, consumo de ração e água,

alteração da locomoção, insuficiência respiratória e cardíaca, piloereção, sialorreia, alteração do SNC, convulsões, tremor, diarreia, letargia e coma.

Para a coleta de sangue, os animais permaneceram em jejum de ração por 4 horas, o sangue foi coletado em tubos especiais por punção cardíaca ventricular para análise hematológica (contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, índices hematimétricos, contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos – neutrófilos, eosinófilos, monócitos, basófilos e análise bioquímica (dosagem de AST, ALT, ureia, creatinina, glicose), havendo também coleta de órgãos (rim, fígado e pulmão) para análise histopatológica.

4. Avaliação da toxicidade crônica com uso prolongado

Foram utilizados 60 ratos Wistar, divididos em três fases: 20 animais para avaliação do desmame até a idade jovem, 20 animais avaliados desde o desmame até a idade adulta e 20 animais acompanhados desde o desmame até a idade senil. Em todas as fases, os animais foram divididos em dois grupos: 10 animais para o grupo controle, recebendo água Mogiana *ad libitum*, e 10 animais do grupo experimental, recebendo água do mar dessalinizada *ad libitum*.

Os animais foram avaliados diariamente no período quanto ao peso, ao consumo de ração e água, às fezes, aos sinais de toxicidade (alteração da locomoção, insuficiência respiratória e cardíaca, piloereção, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e coma) e ocorrência de morte.

5. Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância para medidas repetidas (ANOVA RM) e *software* GraphPadPrism, versão 4.00, para Windows. As diferenças serão consideradas significativas se $p < 0,05$.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista-UNIP.

Resultados

1. Análise *in vitro*

Na análise de viabilidade das células, estas foram avaliadas em monocamada, obtida em três dias de cultura na presença de água. Ambas as células exibiram 100% de viabilidade. As células, quando cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 25% SFB e com água do mar dessalinizada, tiveram viabilidade diminuída, aumentando proporcionalmente com a adição de soro fetal ao meio, sendo (C) 25% SFB, (D) 50% SFB e (E) 75% SFB. Nas células cultivadas na presença da água sem meio de cultura e soro fetal, a viabilidade diminuiu consideravelmente, pois necessitam do soro e do meio de cultura para sobreviver (Gráfico 1).

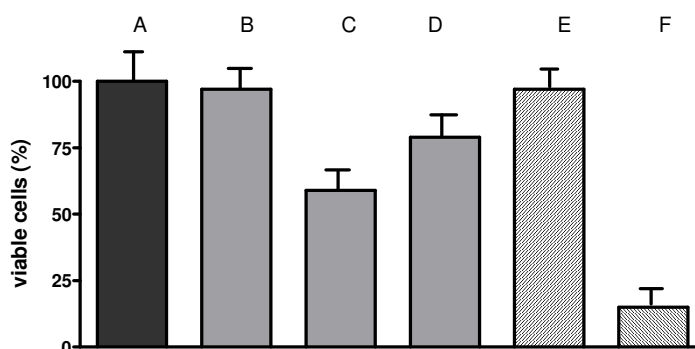


Gráfico 1 – Viabilidade (%) de células de fibroblasto 3T3 através do corante azul de tripan. Células de fibroblasto 3T3 cultivadas na presença de meio RPMI 10% SFB preparado com água convencional (A); células de fibroblasto 3T3 na presença de meio preparado com água do mar dessalinizada (B); com a adição da água do mar dessalinizada com 25% FCS (C); com a adição da água do mar dessalinizada com 50% SFB (D); com a adição da água do mar dessalinizada com 75% SFB; (E) com a adição da água do mar dessalinizada sem soro (F).

Na análise quantitativa, podemos observar que as células, na presença da água do mar dessalinizada, apresentaram viabilidade e proliferaram com índices semelhantes ao controle (meio RPMI 10% SFB) A, B. Quando as células são cultivadas sem soro fetal bovino e meio de cultura somente na presença da água, observamos uma diminuição significativa da viabilidade e proliferação celular (C). Na presença de meio de cultura, a viabilidade e a proliferação aumentam proporcionalmente com adição de SFB na presença da água do mar dessalinizada (Gráfico 2).

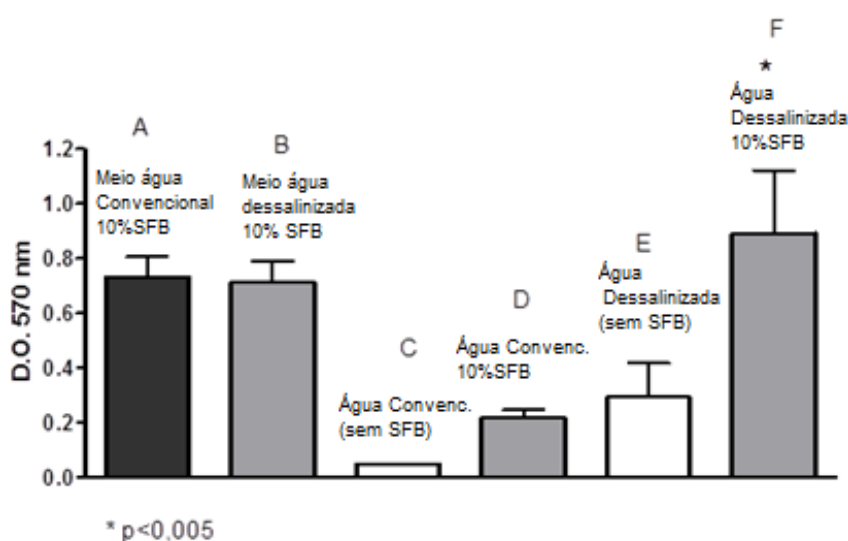


Gráfico 2 – Viabilidade celular pelo método MTT. Células de fibroblasto 3T3 cultivadas na presença de meio RPMI preparado com água convencional 10% (A); na presença de RPMI preparado com água do mar dessalinizada 10% SFB (B); na presença da água convencional sem soro (C); na presença da água convencional com 10% SFB (D); na presença da água do mar dessalinizada sem soro (E); na presença da água do mar dessalinizada 10% SFB.

Dada a capacidade de aumento da resposta proliferativa celular na presença da água dessalinizada, optamos por realizar os testes de proliferação com a linhagem de melanoma murino (B16). Como podemos observar, o aumento da capacidade proliferativa foi significativamente maior na presença da linhagem de fibroblasto normal 3T3, quando comparado à linhagem B16 (melanoma). Na presença da água convencional, não observamos diferença (Gráfico 3).

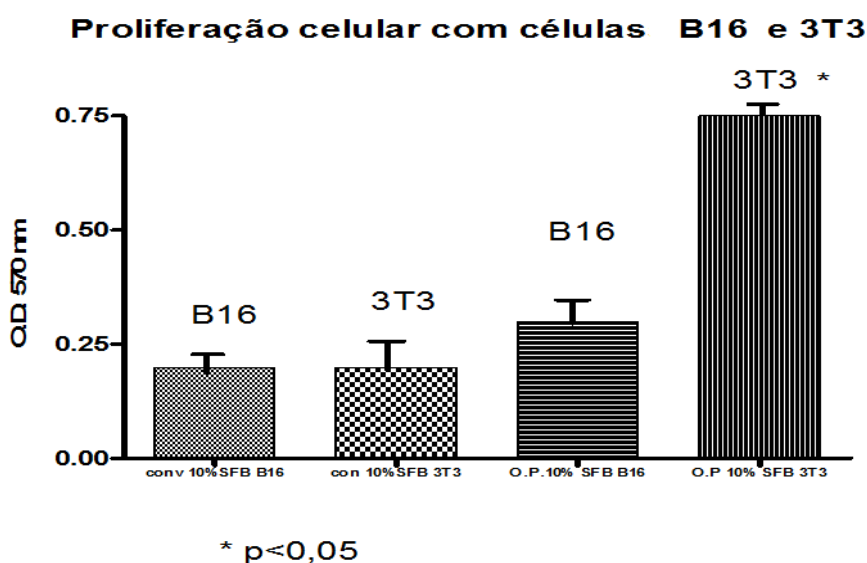


Gráfico 3 – Proliferação celular pelo método MTT de células da linhagem B16 proveniente de melanoma murino e com a linhagem de fibroblasto normal 3T3-NIH cultivadas na presença de RPMI 10% SFB.

Dada a presença de minerais e nutrientes na água do mar dessalinizada, nós investigamos a ação da água nas células do sistema imune através da expressão da molécula do MHC de classe II e CD4 em linhagens de células T humanas. Como mostrado na Figura 1, o nível de expressão de MHC de classe II foi maior na presença da água do mar dessalinizada.

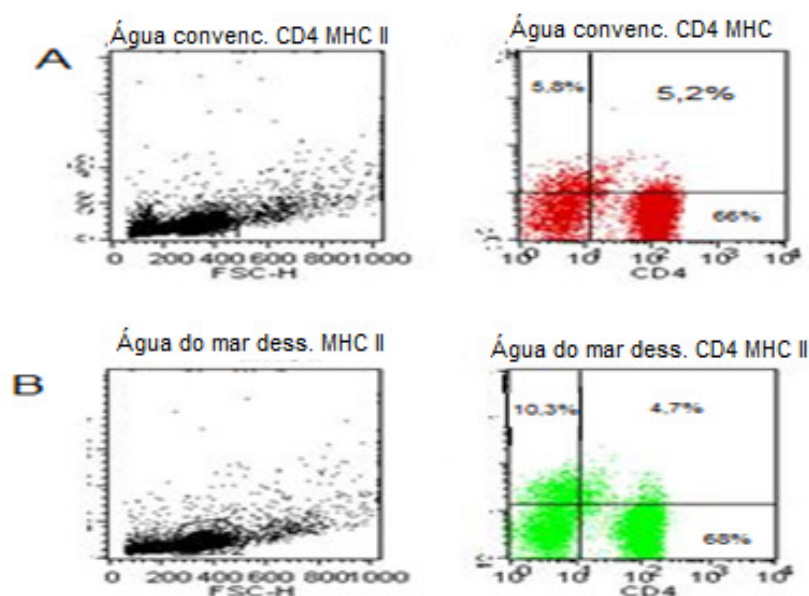


Figura 1 – As linhagens de células THP-1 foram incubadas com RPMI 10% SFB na presença de água convencional (A) e na presença da água do mar dessalinizada (B). As células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 FITC, MHC classe II PE (BD Biosciences). As células foram processadas por citometria FACS flow (Becton Dickinson, San Jose, CA) e analisadas com *software* (Beckton Dickinson). Linfócitos foram localizados de acordo com o tamanho e número (10,00-30,000) e as células analisadas.

Os efeitos combinados de vários minerais e nutrientes são necessários para o máximo da performance celular. É conhecido que a apoptose é responsável pela deleção seletiva de células durante a embriogênese e para a manutenção da homeostasia das populações celulares em contínua renovação. O efeito da água na incidência de apoptose celular foi analisada por citometria de fluxo bidimensional (FACS) usando marcação de anexina V e iodeto de propídio (PI), de acordo com as instruções do fabricante. As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI e os resultados mostraram índices de apoptose maiores na presença de água convencional, quando comparados à água do mar dessalinizada, como mostra a Figura 2.

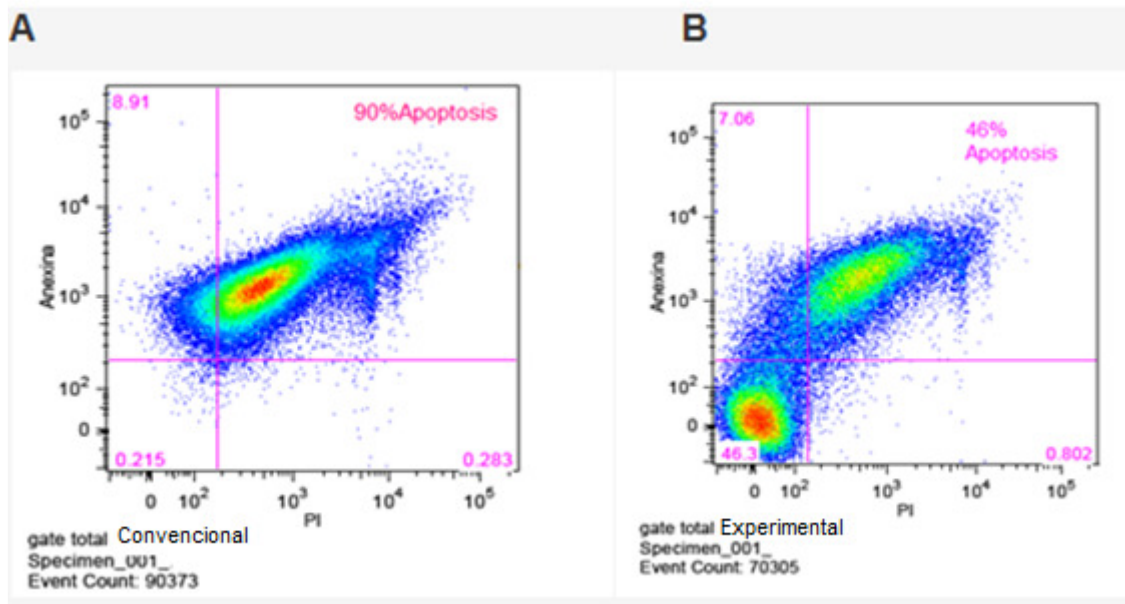


Figura 2 – Níveis de apoptose de células THP-1 em meio de cultura RPMI com água convencional (A) e água do mar dessalinizada (B). Apoptose foi analisada por citometria bidimensional utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI), de acordo com instruções do fabricante (Biotest). Os eventos se acumularam na parte superior e abaixo no quadrante direito simulando células em apoptose.

2. Análise *in vivo* – toxicidade aguda

Nas análises hematológicas, encontramos algumas diferenças interessantes entre os grupos controle e experimental, mas sem diferença significativa, como vemos nos Gráficos 4 e 5 abaixo:

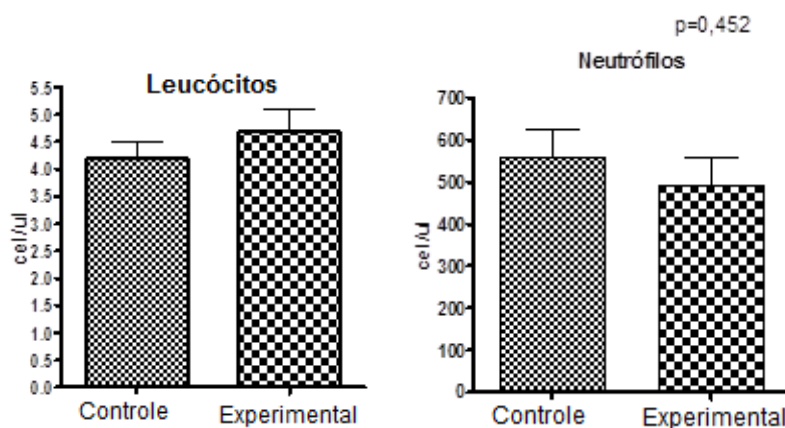


Gráfico 4 – Comparativo: Leucócitos água exp. e cont. teste agudo.

Gráfico 5 – Comparativo: Neutrófilos água exp. e cont. teste agudo.

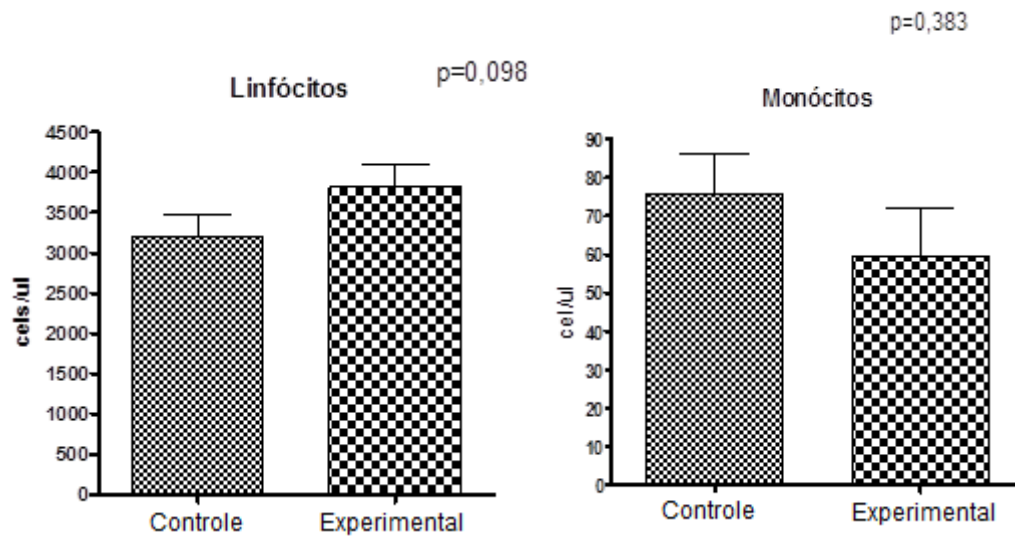


Gráfico 6 – Comparativo: Linfócitos água exp. e cont. teste agudo.

Gráfico 7 – Comparativo: Monócitos água exp. e cont. teste agudo.

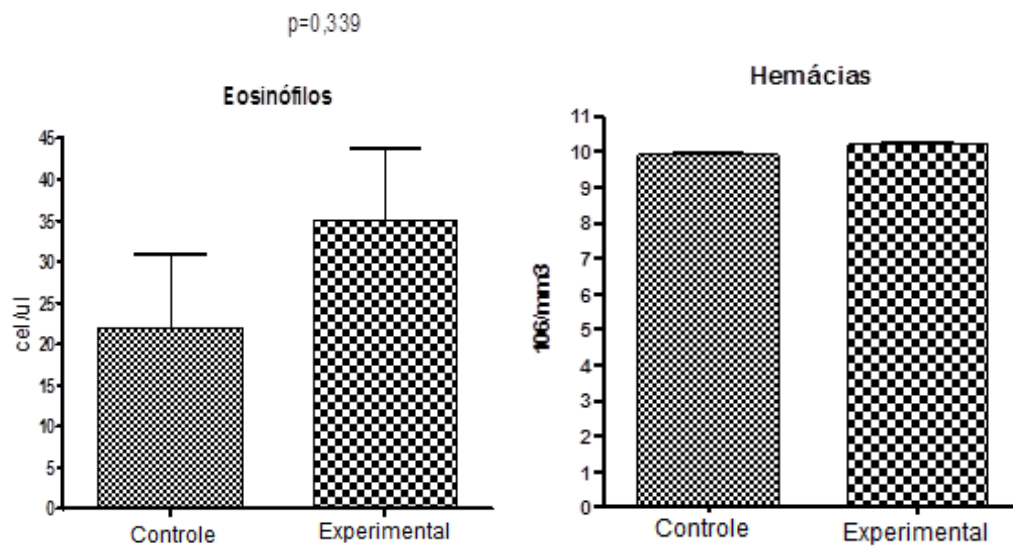


Gráfico 8 – Comparativo: Eosinófilos água exp. e cont. teste agudo.

Gráfico 9 – Comparativo: Hemácias água exp. e cont. teste agudo.

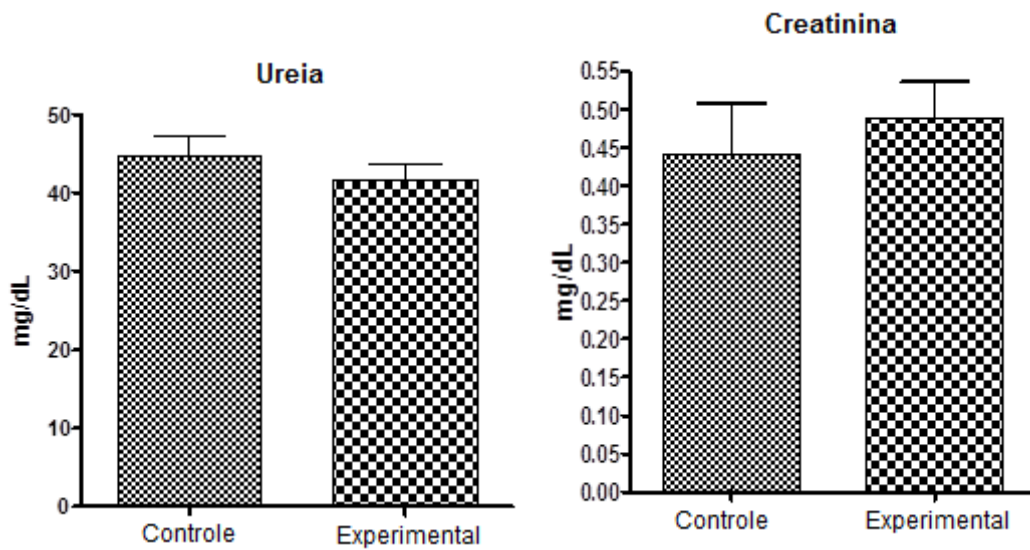


Gráfico 10 – Comparativo: Ureia água exp. e cont. teste agudo.

Gráfico 11 – Comparativo: Creatinina água exp. e cont. teste agudo.

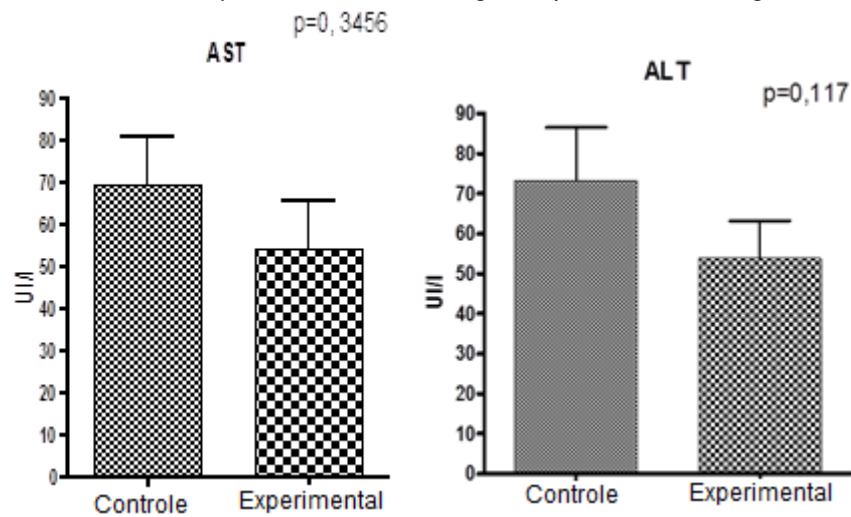


Gráfico 12 – Comparativo: ALT água exp. e cont. teste agudo.

Gráfico 13 – Comparativo: AST água exp. e cont. teste agudo.

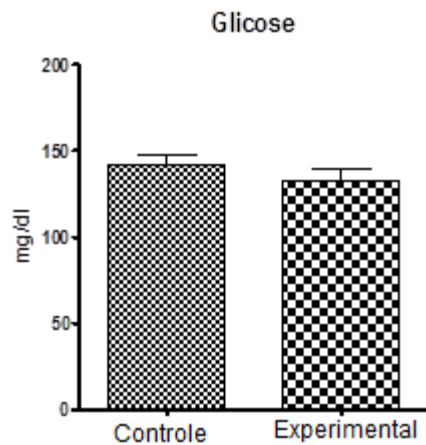


Gráfico 14 – Comparativo: Glicose água exp. e cont. teste agudo.

Na análise clínica, não notificamos qualquer alteração digna de nota (NDN) em sinais clínicos, sem ocorrência de morte nos animais avaliados em dois grupos.

Na análise histopatológica, não observamos alterações no fígado e pulmão, tanto no grupo controle, como no experimental (Figura 3).

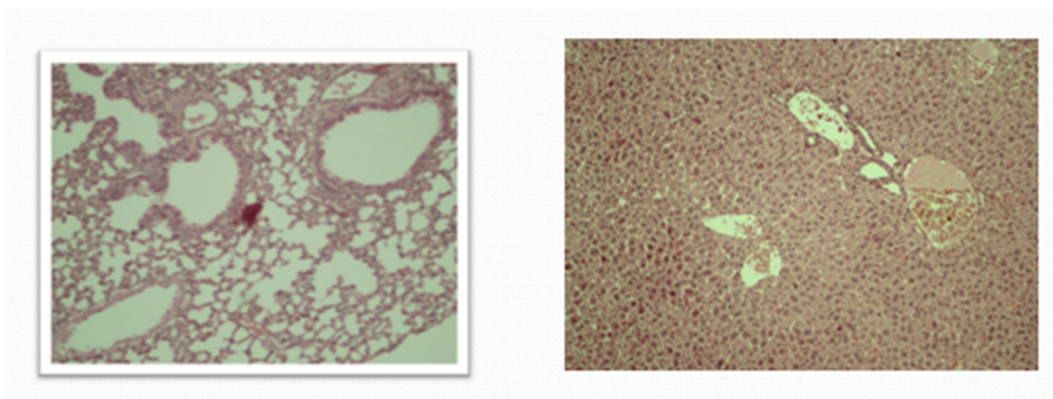


Figura 3 – Padrão histológico de pulmão e fígado, respectivamente, de camundongos do grupo experimental.

O corte do rim de camundongos Balb-c apresentou histologia preservada, epitélio tubular íntegro sem evidências de necrose, nem degeneração vacuolar. Houve discreta dilatação do espaço de Bowman em alguns animais. Adotou-se o sistema de escores para a análise das alterações renais (Figura 4).

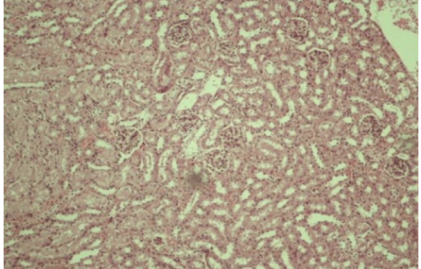
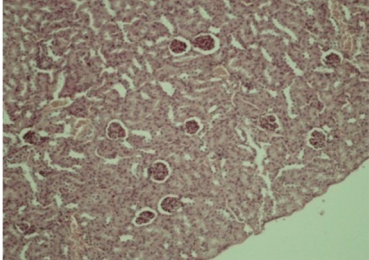
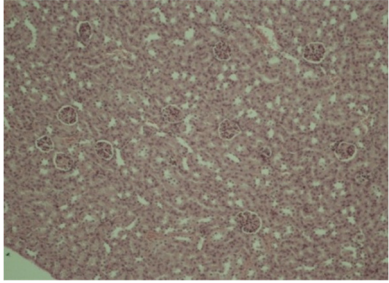
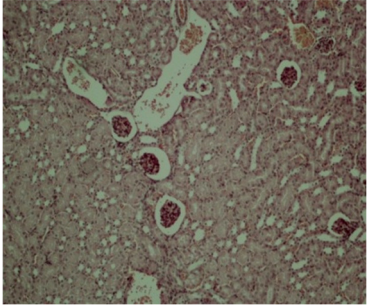
	Escore 0		Escore 2 Glomérulos renais apresentando moderada dilatação do espaço de Bowman
	Escore 1 Glomérulos renais apresentando discreta dilatação do espaço de Bowman		Escore 3 Túbulos renais apresentando severa dilatação do espaço de Bowman

Figura 4 – Análise das características histológicas dos rins de camundongos Balb-c, utilizando-se escores, após indução de toxicidade aguda por doses repetidas, classificando-se de 0 a 3 o nível de alteração (H.E.10X).

As alterações renais foram analisadas quantitativamente por escores, empregando-se teste t (programa GraphPadPrism), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, conforme o gráfico abaixo.

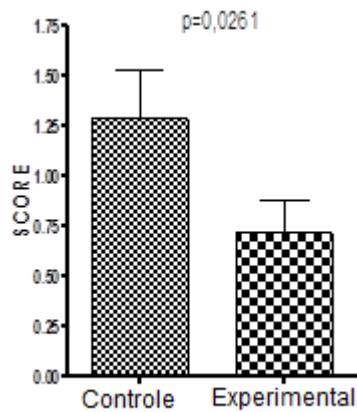


Gráfico 15 – Comparativo: Função renal água exp. e cont. teste agudo.

3. Análise *in vivo* – toxicidade crônica

A análise de toxicidade crônica da fase de **desmame até a idade jovem** apresentou os resultados expostos a seguir.

3.1 Análise hematológica

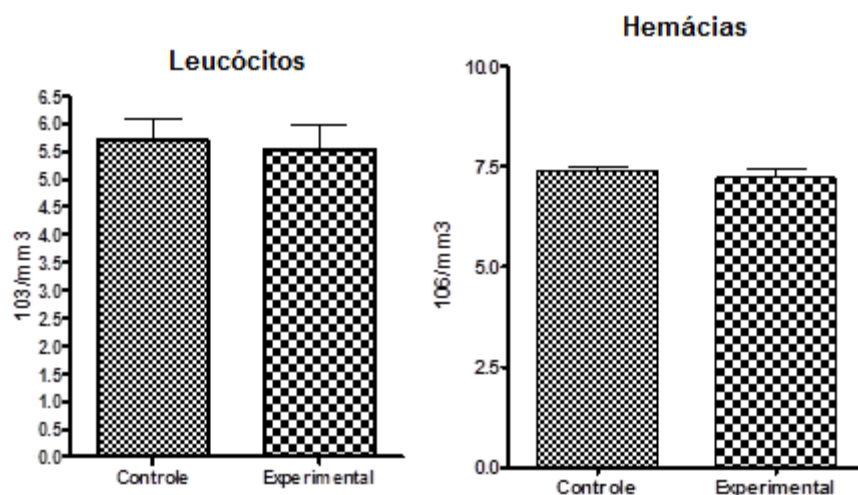


Gráfico 16 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 17 – Comparativo: Hemácias, teste crônico (fase jovem).

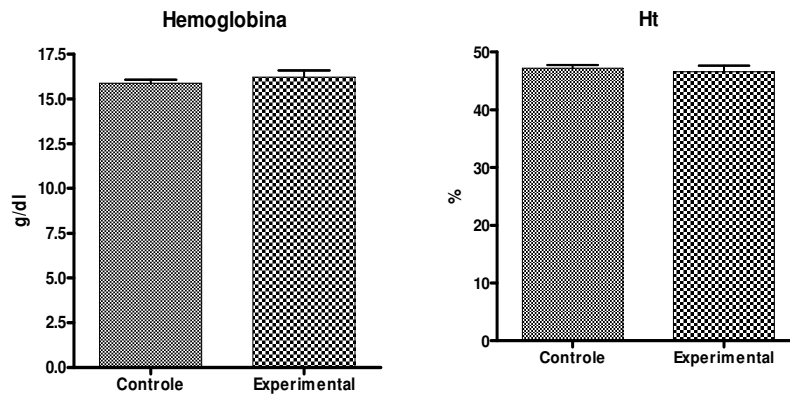


Gráfico 18 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 19 – Comparativo: Ht, teste crônico (fase jovem).

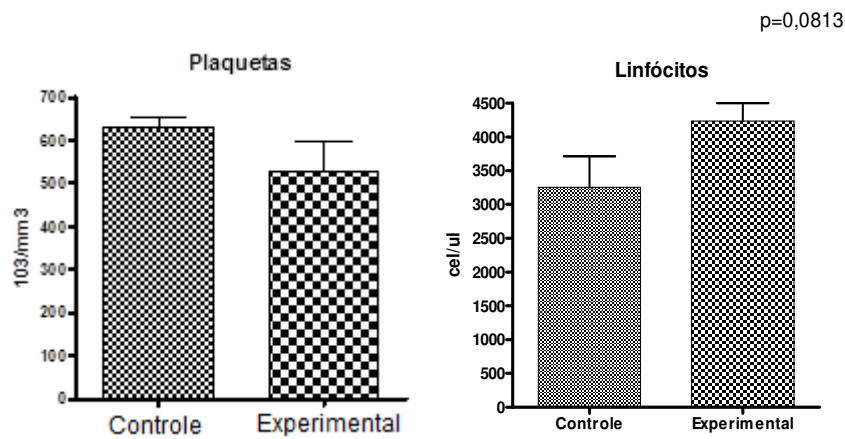


Gráfico 20 – Comparativo: Plaquetas, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 21 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase jovem).

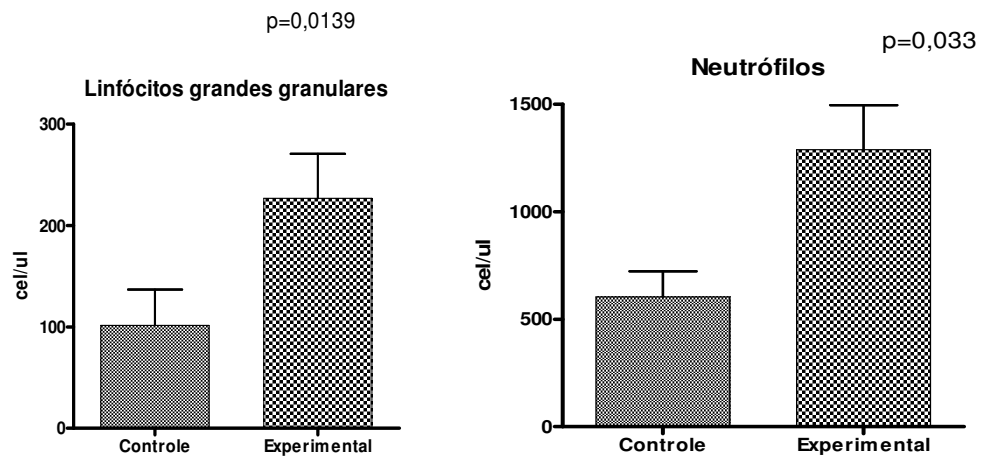


Gráfico 22 – Comparativo: Linfócitos (NK), teste crônico (fase jovem).

Gráfico 23 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase jovem).

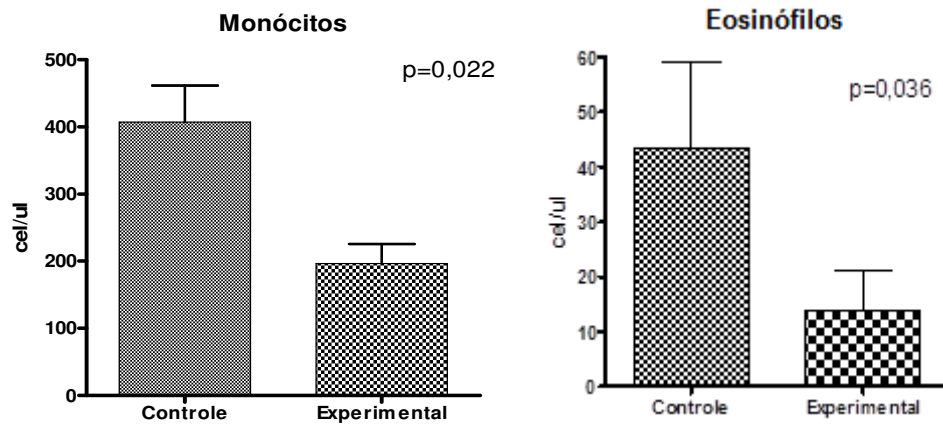


Gráfico 24 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 25 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase jovem).

3.2 Análise bioquímica

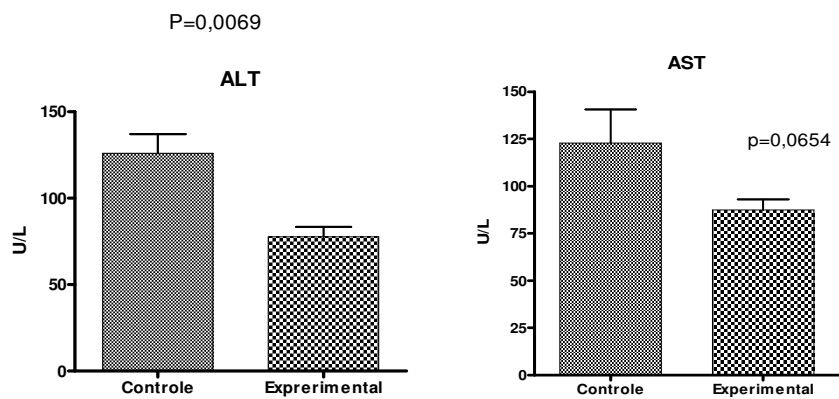


Gráfico 26 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 27 – Comparativo: AST, teste crônico (fase jovem).

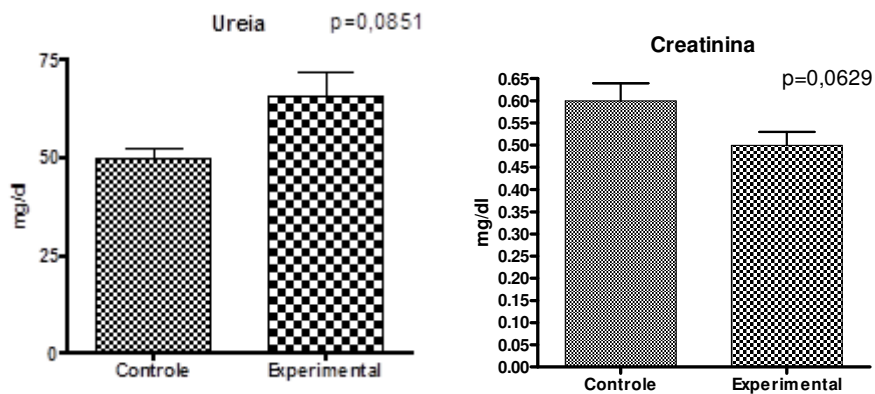


Gráfico 28 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase jovem).

Gráfico 29 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase jovem).



Gráfico 30 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase jovem).

3.3 Análise histológica

Na análise histopatológica do pulmão, não observamos alterações, nem presença de infiltrado inflamatório, não houve aumento dos espaços alveolares, verificando-se, ainda, ausência de fibrose nos animais do grupo controle e experimental (Figura 5).

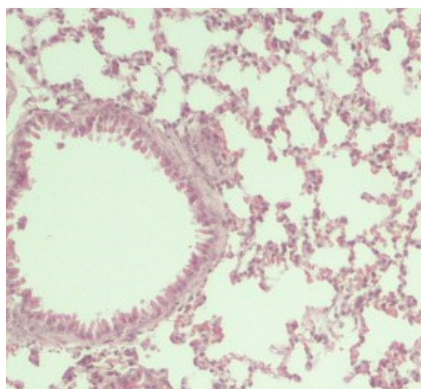


Figura 5 – Padrão histológico de pulmão de ratos Wistar do grupo experimental (H.E.10X).

O corte do rim de ratos Wistar do grupo experimental não apresentou alterações morfológicas, nem infiltração por células inflamatórias. Não houve evidências de necrose, nem degeneração vacuolar, porém observamos discreta irregularidade nos túbulos renais. O escore médio para análise histológica do rim para o grupo controle foi 2,5 e para o grupo experimental foi 1,0, porém sem diferença estatística.

Na análise do fígado, observamos discreta degeneração vacuolar, porém sem presença de infiltrado inflamatório. Na análise da bexiga, não observamos alterações significativas.

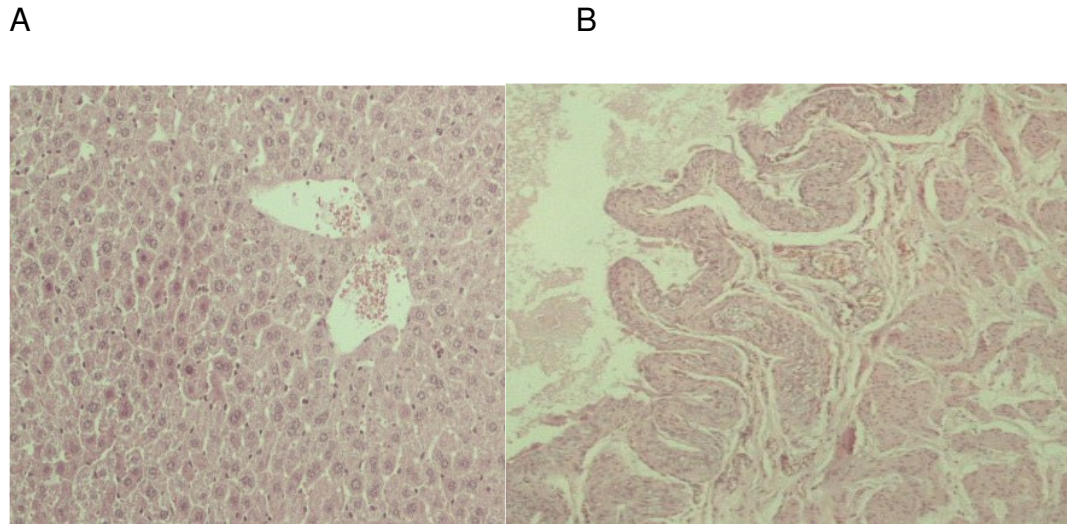


Figura 6 – Padrão histológico de fígado (A) e bexiga (B) de ratos Wistar do grupo experimental (H.E.10X).

Na análise de toxicidade crônica **do desmame até a idade adulta**, obtivemos os resultados a seguir.

3.4 Análise hematológica

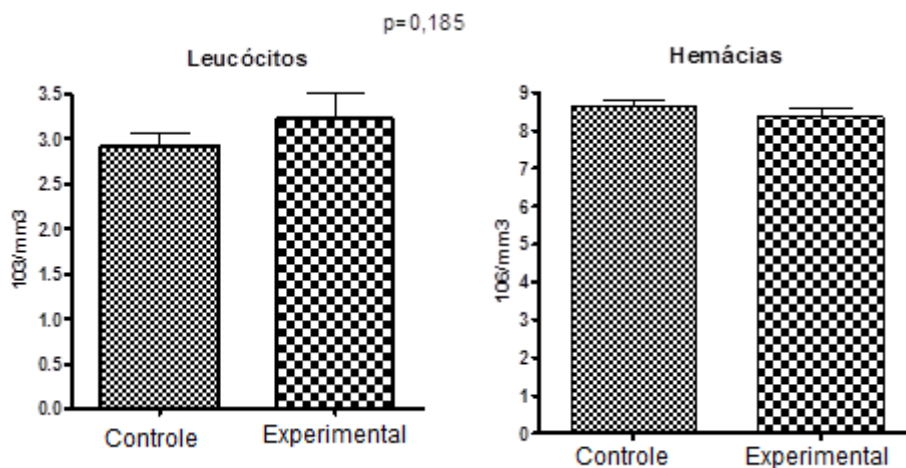


Gráfico 31 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase adulta).

Gráfico 32 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase adulta).

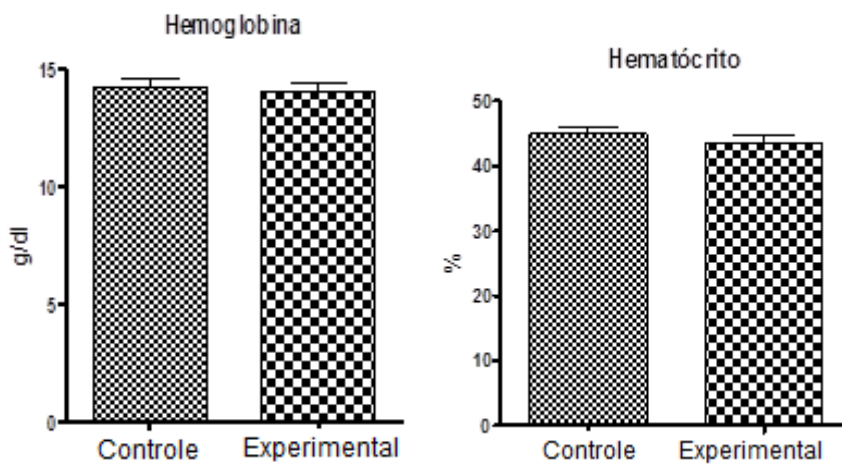


Gráfico 33 – Comparativo: Hemoglobina, teste crônico (fase adulta).

Gráfico 34 – Comparativo: Hematócrito, teste crônico (fase adulta).

$p=0,171$

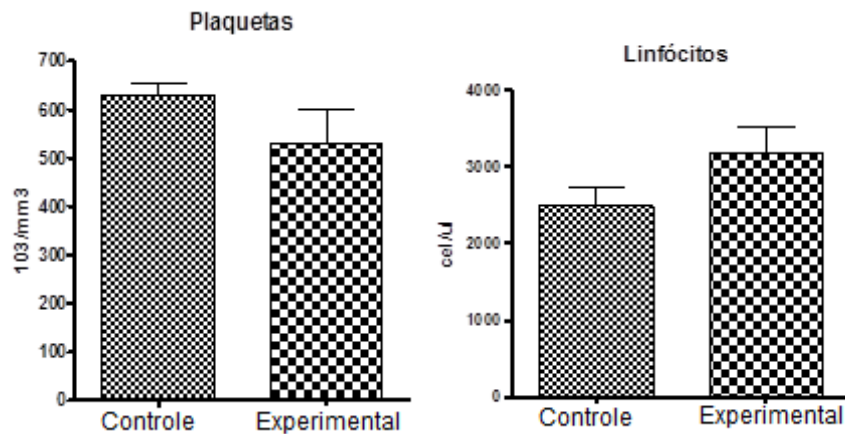
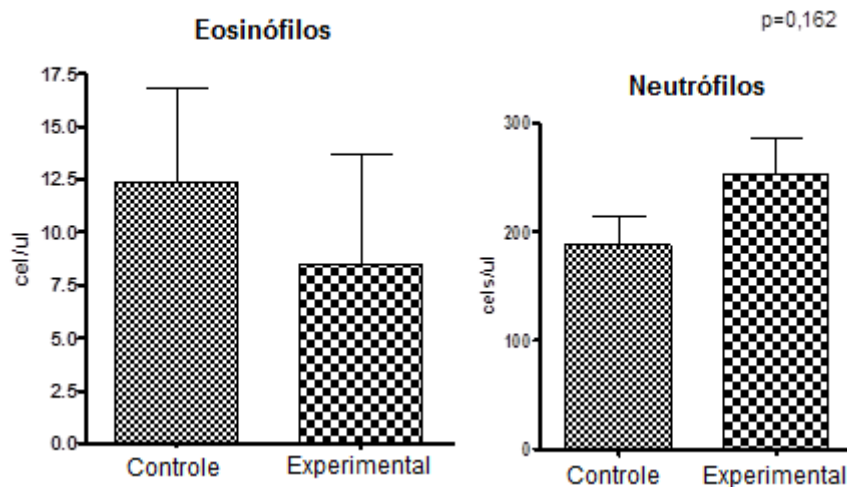


Gráfico 35 – Comparativo: Plaquetas, teste crônico (fase adulta).

Gráfico 36 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase adulta).

$p=0,576$



$p=0,162$

Gráfico 37 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase adulta).

Gráfico 38 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase adulta).

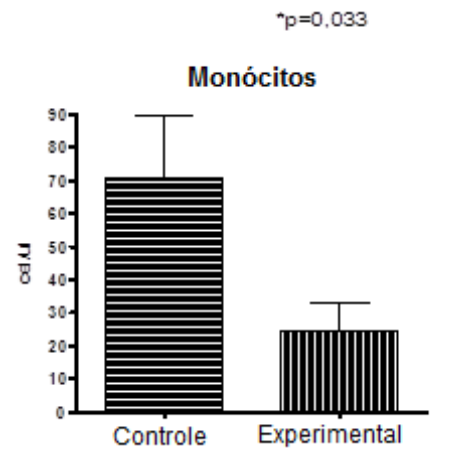


Gráfico 39 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase adulta).

3.5 Análise bioquímica

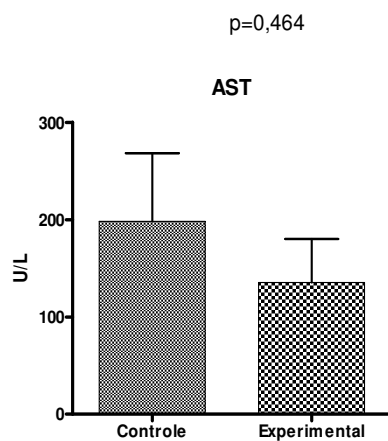


Gráfico 40 – Comparativo: AST, teste crônico (fase adulta).

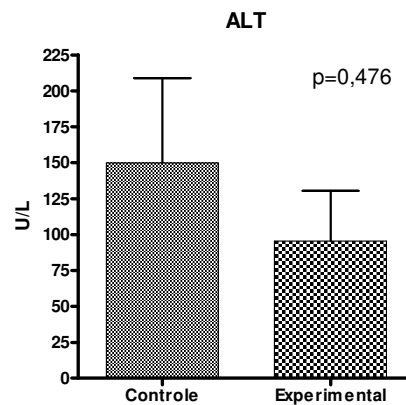


Gráfico 41 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase adulta).

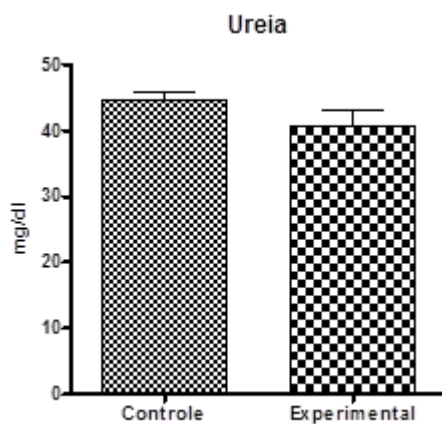


Gráfico 42 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase adulta).

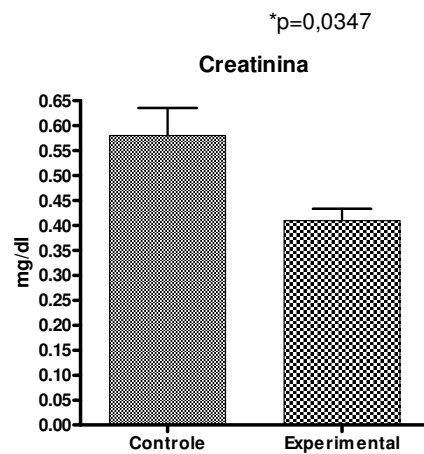


Gráfico 43 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase adulta).

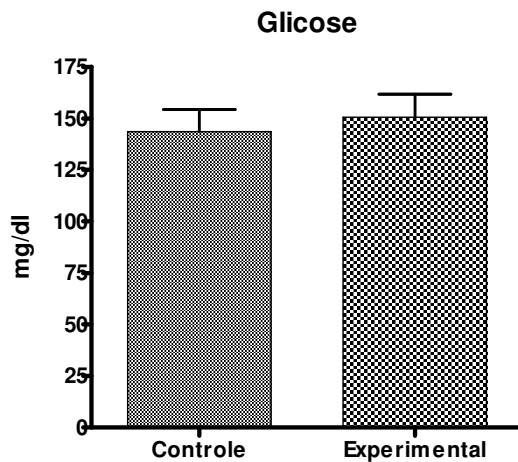


Gráfico 44 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase adulta).

3.6 Análise histológica

O corte do rim de ratos Wistar adultos do grupo experimental apresentou histologia preservada, epitélio tubular íntegro sem evidências de necrose, nem degeneração vacuolar. O escore para análise histológica do rim para o grupo controle foi 0,5 e para o grupo experimental foi 0 (zero).

Na análise histopatológica, não observamos alteração do fígado, bexiga e pulmão tanto nos animais do grupo controle, como no grupo experimental.

A

B

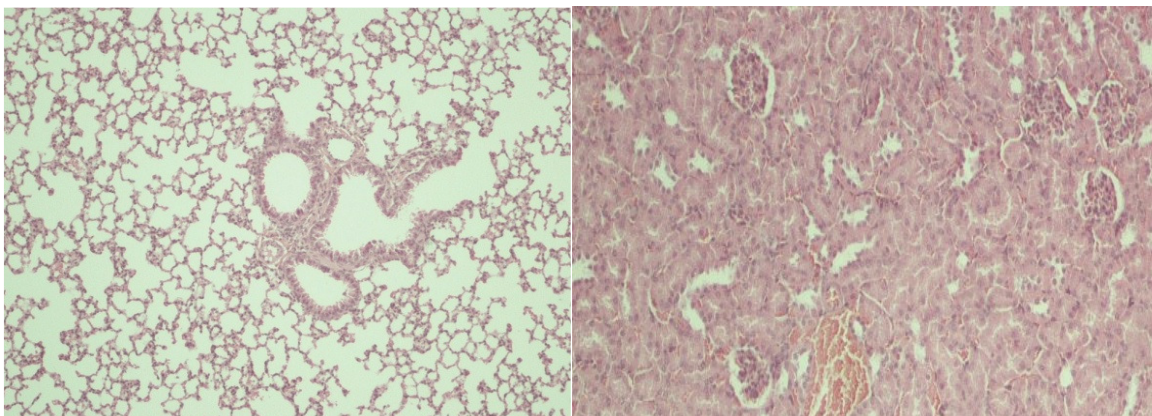


Figura 7 – Padrão histológico de pulmão (A) e rim (B) de ratos Wistar adultos do grupo experimental (H.E.10X).

O rim de alguns camundongos adultos do grupo controle apresentou discreta alteração, porém sem evidência de necrose, nem degeneração vacuolar.

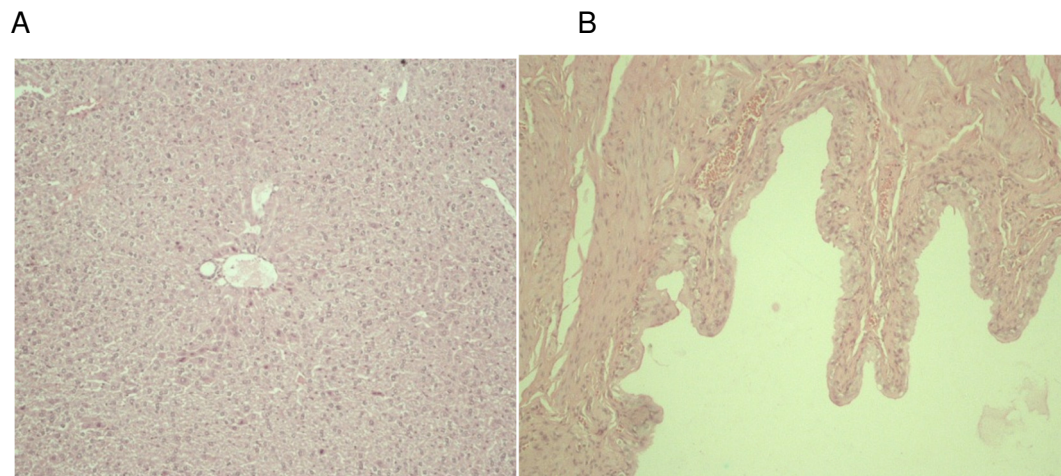


Figura 8 – Padrão histológico de fígado (A) e bexiga (B) de ratos Wistar adultos do grupo experimental (H.E.10X).

Neste estudo, incluímos a análise histológica da bexiga, pois havíamos observado discretas alterações no rim de alguns animais no estudo anterior. Porém, na nova análise, não observamos alterações na bexiga nos animais do grupo controle, nem no grupo experimental.

Na análise de toxicidade crônica da fase de **desmame até a idade senil**, obtivemos os resultados a seguir.

3.7 Análise hematológica

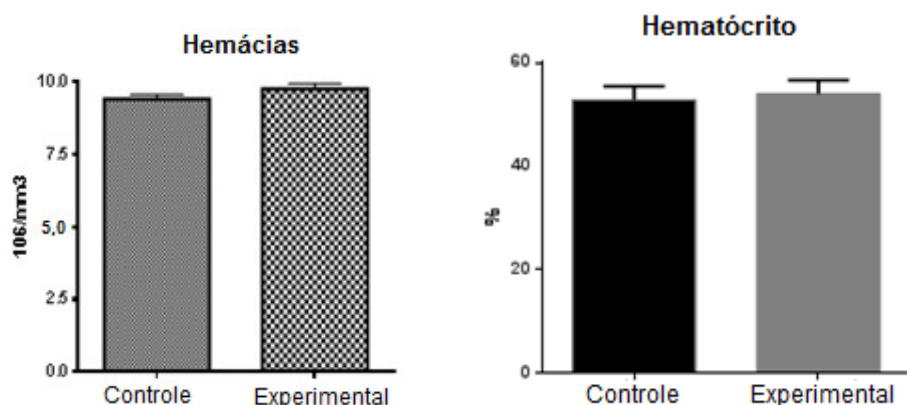


Gráfico 45 – Comparativo: Hemograma, teste crônico (fase senil).

Gráfico 46 – Comparativo: Hematócrito, teste crônico (fase senil).

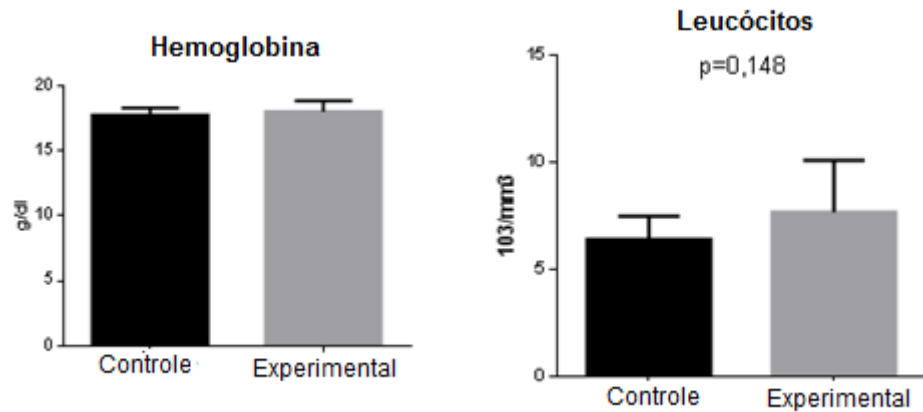


Gráfico 47 – Comparativo: Hemoglobina, teste crônico (fase senil).

Gráfico 48 – Comparativo: Leucócitos, teste crônico (fase senil).

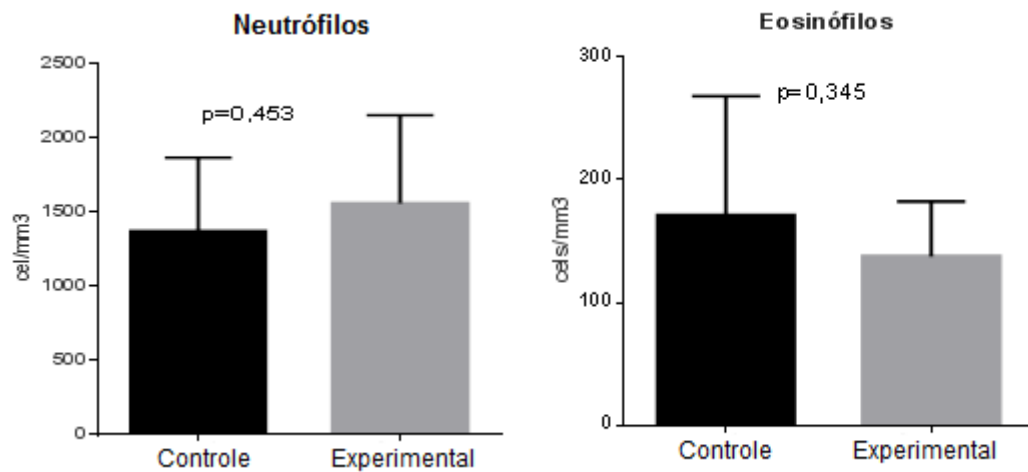


Gráfico 49 – Comparativo: Neutrófilos, teste crônico (fase senil).

Gráfico 50 – Comparativo: Eosinófilos, teste crônico (fase senil).

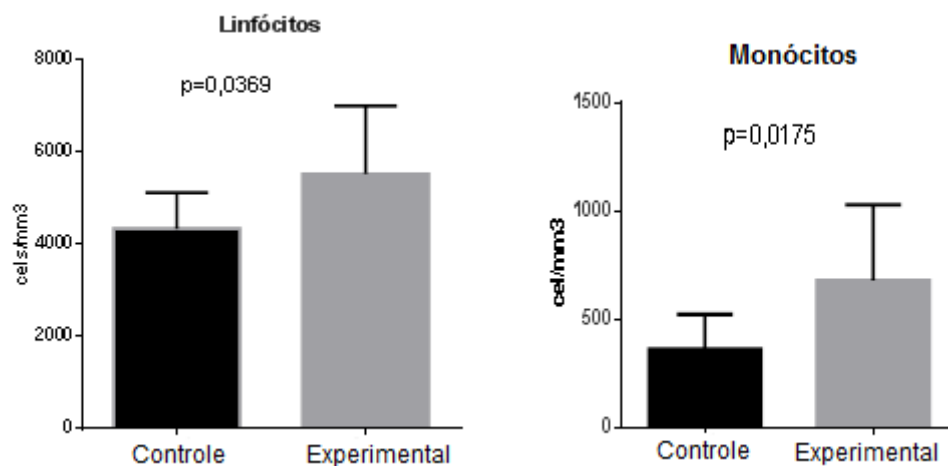


Gráfico 51 – Comparativo: Linfócitos, teste crônico (fase senil).

Gráfico 52 – Comparativo: Monócitos, teste crônico (fase senil).

3.8 Análise bioquímica

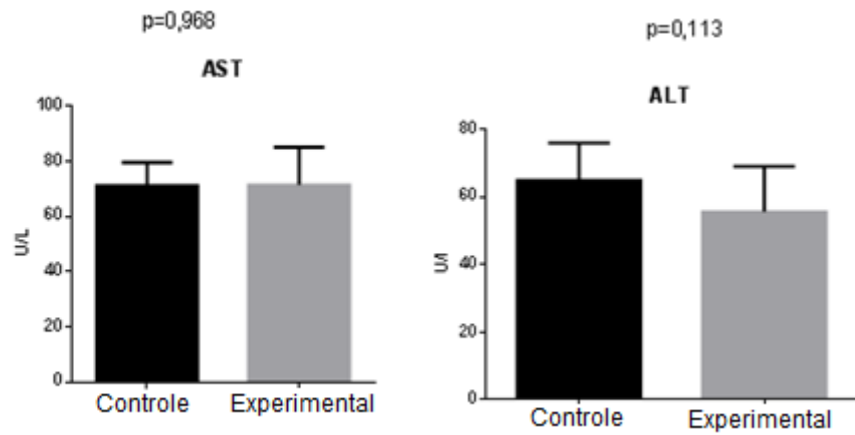


Gráfico 53 – Comparativo: AST, teste crônico (fase senil).

Gráfico 54 – Comparativo: ALT, teste crônico (fase senil).

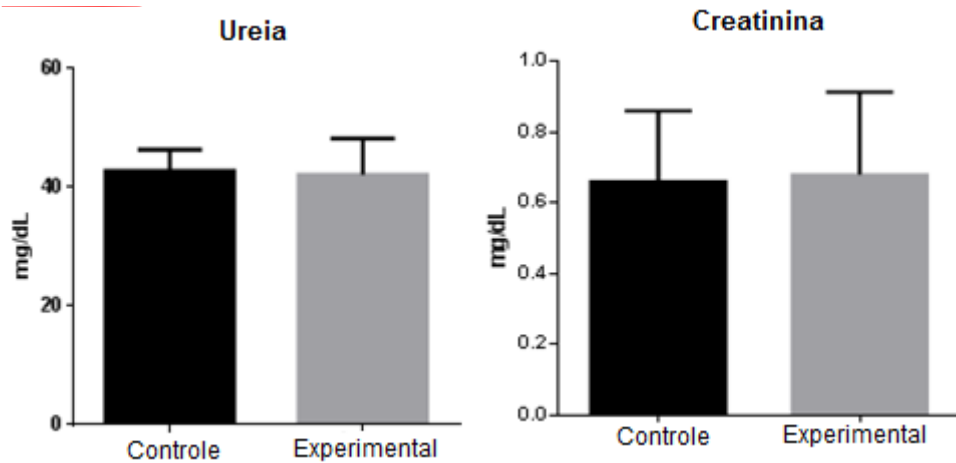


Gráfico 55 – Comparativo: Ureia, teste crônico (fase senil).

Gráfico 56 – Comparativo: Creatinina, teste crônico (fase senil).

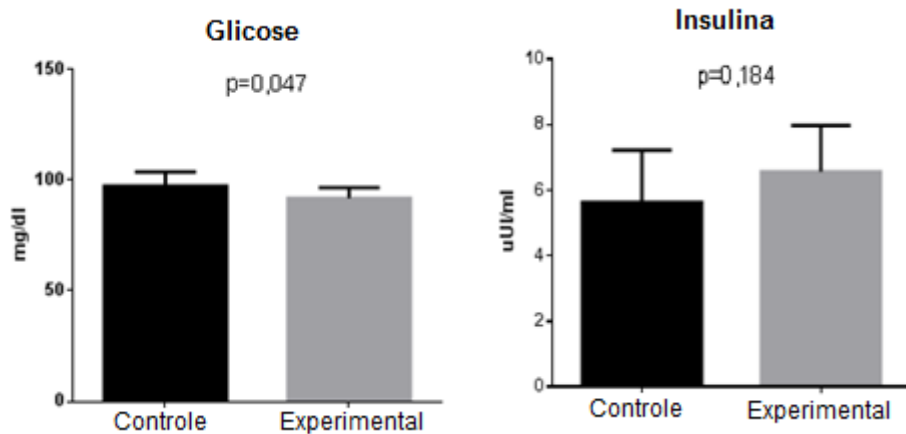


Gráfico 57 – Comparativo: Glicose, teste crônico (fase senil).

Gráfico 58 – Comparativo: Insulina, teste crônico (fase senil).

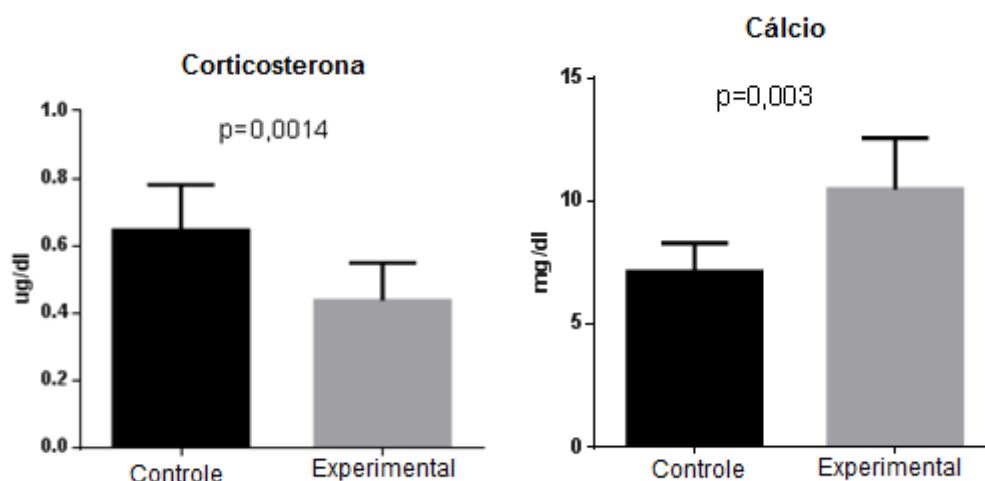


Gráfico 59 – Comparativo: Corticosterona, teste crônico (fase senil).

Gráfico 60 – Comparativo: Cálcio, teste crônico (fase senil).

Quanto à análise clínica, não observamos nenhuma alteração, no período, em relação ao peso, ao consumo de ração e água, às fezes, a sinais de toxicidade (alteração da locomoção, insuficiência respiratória e cardíaca, piloereção, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e coma), nem ocorrência de morte em nenhuma das fases estudadas.

Observamos que o consumo de água pelos animais que receberam a água do mar dessalinizada foi maior em relação aos animais do grupo controle em todos os períodos.

Discussão

Este estudo demonstra que a água do mar dessalinizada não apresenta efeitos tóxicos sobre as células, uma vez que não demonstrou efeitos tóxicos em camundongos, mesmo com o teste de toxicidade aguda. De qualquer forma, precisamos de estudos em seres humanos, a fim de revelar os efeitos da água dessalinizada na saúde.

De maneira semelhante aos dados deste estudo, no qual não encontramos citotoxicidade na cultura *in vitro*, dois outros estudos apresentam resultado similares, um deles é de Hwang et al. (2009). Os autores testaram a citotoxicidade da água do

mar em células pré-adipócitas 3T3-L1. As células foram semeadas numa placa de 96 poços e cultivadas com água do mar com dureza de diferentes concentrações, durante 48 horas. Não foi encontrada citotoxicidade celular significativa na cultura, mesmo com a dureza da água em 1.500. Outro estudo, de Li et al., publicado em 2014, constatou que a utilização de água do fundo do mar *in vitro* não provocou citotoxicidade, apesar disso, os autores observaram uma redução na proliferação de células do músculo liso dos vasos sanguíneos, diferentemente do resultado obtido no presente estudo, por esse motivo houve uma redução na chance de estenose do vaso, promovendo, assim, um fator de protetor para doenças cardiovasculares.

Autores utilizaram um experimento com células ósseas (proteoblastos – MC 3T3) para avaliar a viabilidade celular e a proliferação através do método MTT, comparando a água do mar dessalinizada com uma água controle. Eles puderam observar um aumento significativo de viabilidade e maior proliferação celular na cultura com água do mar dessalinizada, quando comparada ao controle (Liu et al., 2013). Esses dados são similares aos encontrados neste estudo.

Soyoung et al. (2013) realizaram um estudo de cultura de células de câncer de mama e verificaram que, na presença de água do mar, as células reduziam dramaticamente seu potencial metastático. Mesmo sem mecanismo totalmente elucidado, os autores acreditam que a presença de minerais na água do mar, por mediação de reações bioquímicas, vias de sinalização e migração celular, poderia contribuir para a maior sobrevida em pacientes com câncer. Os resultados desses autores são semelhantes aos observados, quando comparamos a proliferação celular reduzida no teste com o melanoma murino B16, indicando menor proliferação metastática da água do mar dessalinizada quando comparada ao crescimento celular da cultura sadia.

Também discutindo sobre o efeito observado na proliferação de células de melanoma, Stonike Fedorov (2014), em seu artigo de revisão, mostrou que muitos metabólitos secundários isolados a partir de organismos marinhos foram mencionados como agentes anticancerígenos potenciais. Testes de quimioprevenção *in vitro* e *in vivo* sugeriram que estes produtos marinhos podem ser capazes de auxiliar na prevenção e no tratamento de câncer.

No trabalho de Li et al. (2014), os autores fazem um ensaio Transwell para determinar o efeito da água do mar em células do músculo liso dos vasos sanguíneos. Nesse teste, observaram níveis elevados de proliferação na presença de 15% de SFB, induzindo a migração das células avaliadas em comparação ao grupo 0,5% de SFB, ou seja, o efeito de promover a migração pode ser marcadamente atenuado por incubação com água do mar, em um modo dose-dependente, o que também realizamos em nosso projeto, observando que a proliferação celular é dependente da dose de SFB com água do mar dessalinizada e convencional em diferentes concentrações.

No teste de toxicidade aguda *in vivo*, não observamos alterações hematológicas (número de eritrócitos, quantidade de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, hemácias e índices de células da série branca). Na contagem diferencial, houve um aumento do número de linfócitos e eosinófilos ($p = 0,098$ e $p = 0,339$, respectivamente) e diminuição do número de neutrófilos e monócitos ($p = 0,452$ e $p = 0,383$, respectivamente), mas sem diferença significativa.

Observou-se, neste teste, que os animais que receberam água do mar dessalinizada apresentaram níveis mais baixos de ALT (alanina aminotransferase) e de AST (aspartato aminotransferase) em comparação com os animais do grupo controle. Mesmo com a ingestão de doses elevadas e altas concentrações de minerais, a água dessalinizada não causou alterações significativas nos rins, mantendo a função renal preservada, com níveis de ureia e de creatinina normais e significativamente melhores sob o ponto de vista histológico em comparação com o controle. Não foram observadas alterações no fígado e pulmões de animais nos grupos controle e experimental. Corroborando nossos achados, um estudo prévio de Tsuchiya et al. (2004) testou o uso oral de água do mar em camundongos, para avaliar valores hematológicos. Como resultado, nenhum animal mostrou sinais de intoxicação, ganho de peso e mudança de crescimento, quando comparado ao grupo controle, os autores então concluíram que a água do mar tratada pode ser segura para consumo, o que, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que um trabalho posterior em humanos seria viável.

Já nos resultados do teste de toxicidade crônica, observamos que nenhum dos animais dos grupos experimental e controle apresentou sinais clínicos de

toxicidade, alteração de ganho de peso, de locomoção, ou alterações no SNC, não havendo ainda alterações histopatológicas significantes.

Segundo Mendes et al. (2000) e Medeiros et al. (2006), a eosinofilia (contagem sérica de eosinófilos totais acima de 350 cel/ mm³) pode desencadear o aumento de uma resposta alérgica respiratória ou cutânea. Essa elevação da concentração de eosinófilos poderia ser responsável pelo aumento de IgE, imunoglobulina elevada nas respostas alérgicas, segundo Kimata et al. (2002). A avaliação de adultos que sofriam de rinite alérgica, após o consumo de água do mar dessalinizada por três semanas, apresentou uma redução dos níveis séricos de IgE, indicando diminuição do processo alérgico cutâneo e melhora da rinite, quando comparado ao grupo controle. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, em todas as fases estudadas, os animais apresentaram níveis de eosinófilos reduzidos quando comparado ao grupo controle, sugerindo que a água do mar dessalinizada poderia reduzir a incidência de processos alérgicos de caráter cutâneo ou respiratório nesses animais.

A resposta a patógenos como bactérias, vírus, fungos e protozoários depende da ação do sistema imune inato e adquirido. Os linfócitos fazem parte de ambas as respostas, diferenciando-se em células Natural Killers, linfócitos T e B (SLAUENWHITE e JOHNSTON, 2015). Encontramos, nos resultados, elevação de linfócitos sanguíneos, quando comparado ao grupo controle em todas as fases estudadas, o que poderia sugerir uma resposta imunológica mais eficaz no grupo experimental. Além disso, o aumento significativo dos linfócitos grande granulares (células Natural Killers) do grupo experimental comparado ao controle indica a possível melhora da resposta imunológica imediata mediada por esse tipo celular.

Outro tipo celular que desempenha papel importante na resposta imune inata são os neutrófilos, que compõem a família de granulócitos das células brancas do sangue e são componentes cruciais da resposta imune inata, sendo altamente diferenciados. Atuam na primeira linha de defesa e estão envolvidos na destruição de microrganismos (TAVARES, 2013). Segundo nossos resultados, em todas as fases de vida estudadas, os neutrófilos apresentaram-se em níveis mais elevados no grupo experimental em comparação ao grupo controle, sugerindo e sustentando ainda mais a ideia de que os animais tratados com a água do mar dessalinizada,

teriam uma melhora na resposta imune inata, quando comparados aos animais que consumiram água Mogiana *ad libitum*.

Segundo Nunes e Moreira (2007), as transaminases são indicadoras sensíveis de dano hepático, particularmente quando se trata de uma lesão aguda. Incluem a AST e a ALT. A AST existe também em outros tecidos, como coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é muito menos específica de lesão hepática do que a ALT, que existe primariamente no fígado. Assim, quando temos uma lesão hepática, há refluxo de ambas as enzimas para o plasma com elevação dos seus níveis, verificando-se que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST, se a lesão for puramente hepática. Segundo os resultados encontrados no presente estudo, em todas as idades, há redução de ALT e AST, porém sem diferença significativa. Essa redução dos níveis de transaminases sugere que a água do mar dessalinizada não causa nenhum tipo de toxicidade hepática; além disso, por apresentarem valores menores, sugerem que causam menor sobrecarga à função hepática, em comparação ao grupo controle.

Ureia e creatinina sérica são utilizadas como biomarcadores de função renal. Valores alterados desses parâmetros estão relacionados com algum tipo de lesão renal, como a filtração glomerular. Porém, em idosos, são esperados valores de creatinina mais elevados quando comparados aos jovens (ABENSUR, 2011). Em nossos achados, encontramos valores similares de ureia em ambas as fases e valores reduzidos de creatinina na idade jovem e adulta, sinalizando que, apesar da elevada quantidade de minerais presentes na água do mar dessalinizada, não há evidência de efeito tóxico sobre a função renal. Além disso, encontrarmos uma discreta irregularidade nos túbulos renais dos animais, no entanto, no grupo controle na idade jovem, foi mais acentuada quando comparada ao grupo experimental.

O hormônio corticosterona é produzido pelas glândulas adrenais tanto de maneira rítmica, como em resposta a um estímulo injuriante, podendo agir sobre o desenvolvimento, o metabolismo e o sistema imune (MORAES, 2010). A redução significativa desse hormônio na utilização da água dessalinizada, a longo prazo, pode indicar uma ação mais eficaz do sistema imunitário e melhor controle glicêmico de animais do grupo experimental na idade senil.

O cálcio é um elemento fundamental ao organismo, entretanto não é produzido endogenamente, sendo adquirido somente através da ingestão diária de alimentos que o contêm. A grande maioria da população não ingere quantidades adequadas deste elemento. A osteoporose é uma doença ocasionada pelo desbalanço da remodelagem óssea. O principal tipo de osteoporose ocorre em mulheres pós-menopáusicas, na faixa etária de 50-70 anos de idade (GRÜDTNER, 1997). No artigo de Liu e colaboradores (2013), os autores compararam a quantidade sérica de cálcio de animais com osteoporose induzida e observaram que três meses de ingestão de água do mar (5,2 mL/dia) indicou um aumento nos níveis de cálcio sérico, porém sem diferença significativa, diferente dos resultados encontrados em nosso estudo. Apesar disso, autores observaram uma melhora significativa na densidade óssea dos animais tratados com a água do mar dessalinizada.

Conclusão

A água do mar dessalinizada tem, em sua composição, minerais que desempenham um papel importante nas atividades e funções celulares, o que é comprovado por ensaios de proliferação e viabilidade celular, quando comparados aos resultados obtidos na presença de água potável convencional como controle. Além disso, a água do mar dessalinizada estimula a expressão de marcadores imunológicos, que podem ter implicações importantes nos mecanismos de defesa contra doenças, e não exibe toxicidade celular *in vitro*, conforme os métodos utilizados neste estudo.

In vivo, observamos que a água do mar dessalinizada não apresenta nenhum efeito tóxico no teste de toxicidade aguda, mesmo a longo prazo. Ademais, apresentou melhora em vários parâmetros, como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, cálcio e corticosterona, no controle de função hepática com melhores resultados das transaminases (ALT e AST), na preservação da função renal e dos parâmetros de creatinina e ureia, quando comparados ao grupo controle.

Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação e da importância da água do mar dessalinizada em processos biológicos. Da mesma forma, mais estudos devem ser realizados para observar os efeitos e benefícios em seres humanos.

Referências

1. Abensur H. 2011. Biomarcadores na Nefrologia. Roche, São Paulo. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>>.
2. Bernardo M, Castro A, Araque J, Osorio A. 2003. Evaluation of physico-chemical, microbiological and toxicological quality of seawater as a nutritional supplement in biological models. *Toxicology magazine online*.1, 1-21.
3. Fu Z, Yang F, Hsu H, Lu Y. 2012. Drinking deep seawater decreases serum total and low-density lipoprotein–cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *J Med Food*. 15 (6), 535-541.
4. Grüdtner VS, Weningrill P, Fernandes AL. 1997. Aspectos da absorção no metabolismo de cálcio e vitamina D. *Rev Bras Reumatol*. 37 (3), 143-151.
5. Ha B, Shin E, Park E, Shon Y. 2013. Anti-diabetic effect of balanced deep-sea water and its mode of action in high-fat diet induced diabetic mice. *Mar Drugs*.11, 4193-4212.
6. Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, Kimata H. 2005. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome. *European Journal of Clinical Nutrition*. 59, 1093-1096.
7. Hou C et al. 2013. Deep ocean mineral water accelerates recovery from physical fatigue. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 10(1), 7.
8. Hwang H et al. 2009. Inhibitory effect of deep-sea water on differentiation of 3t3-l1 adipocytes. *Mar Biotechnol*. 11(2), 161-168.
9. Jéquier E, Constant F. 2010. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, 115-123.
10. Kim S, Chun S, Lee D, Lee K, Nam K, 2013. Mineral-enriched deep-sea water inhibits the metastatic potential of human breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. 43, 1691-1700.
11. Kimata H, Tai H, Nakajima H. 2001. Reduction of allergic skin responses and serum allergen-specific IgE and IgE-inducing cytokines by drinking deep-sea water in patients with allergic rhinitis. *Otorhinolaryngol Nova*. 11, 302-303.

- 12.Li P et al. 2014. Deep sea water prevents balloon angioplasty-induced hyperplasia through MMP-2: An in vitro and in vivo study. PLoS ONE. 9(5), e96927.
- 13.Liu H et al. 2013. Potential osteoporosis recovery by deep sea water through bone regeneration in SAMP8 Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-10.
- 14.Santos MRV et al. 2010. Parâmetros Bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattusnovergicus* – linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena. 6, 10, 1-6.
- 15.Medeiros D et al. 2006. Nível sérico de IgE total em alergia respiratória: estudo em pacientes com alto risco de infecção por helmintos. J. Pediatr. 82(4): 255-259.
- 16.Mendes DM et al. 2000. Eosinofilia. Rev. Bras. Alerg. Immunopatol. 23(2): 84-91.
- 17.Miyamura M et al. 2004. Difference between Deep Seawater and Surface Seawater in the Preventive Effect of Atherosclerosis. Biol. Pharm. Bull. 27(11), 1784-1787.
- 18.Moraes RC. Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- 19.Nunes PP, Moreira AD. 2007. Fisiologia hepática. Faculdade de Medicina do porto, Serviço de Fisiologia. 1-26.
- 20.Pereira VR et al. 2003. Avaliação hematológica e histopatológica de camundongos BALB-c e C57BL-6 expostos aos antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(6) 739-742,.
- 21.Popkin B, D´ancy K, Rosenberg I. 2010. Water, hydration and health. Nutr Rev. 68(8), 439-458.
- 22.Porter A, Youtie J. 2009. Where does nanotechnology belong in the map of science? Nature Nanotechnology. 4, 534-536.

23. Riley M, Gerba C, Elimelech M. 2011. Biological approaches for addressing the grand challenge of providing access to clean drinking water. *Journal of Biological Engineering*. 5(1), 1-9.
24. Sheu M et al. 2013. Deep sea water modulates blood pressure and exhibits hypolipidemic effects via the AMPK-ACC Pathway: An in vivo study. *Mar. Drugs*. 11, 2183-2202.
25. Slauenwhite D, Johnston B. 2015. Regulation of NKT Cell localization in homeostasis and infection. *Front Immunol*. 6: 255.
26. Soler W et al. 2006. Research on the effect of sea water consumption in humans. VII International Meeting of Sea Water. 1, 1-13.
27. Souza LF. 2006. Dessalinização como fonte alternativa de água potável. *Norte Científico*. 1(1), 84-97.
28. Stonik V, Fedorov S. 2014. Marine low molecular weight natural products as potential cancer preventive compounds. *Marine Drugs*. 12(2), 636-671.
29. Tavares NM. Avaliação dos mecanismos de controle da infecção por *Leishmania amazonensis* em neutrófilos humanos: papel do LT B₄. 2013. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz. Salvador/BA.
30. The National Academies Press. 2005. Dietary reference intake for water potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington, 73.
31. Tsuchiya Y et al. 2003. Effects of hot deep seawater bathing on the immune cell distribution in peripheral blood from healthy young men. *Environ. Health Prev. Med*. 8(5), 161-165.
32. Tsuchiya Y et al. 2004. Effects of desalted deep seawater on hematologic and blood chemical values in mice. *J. Exp. Med*. 203(3), 175-182.
33. Velásquez-Meléndez G et al. 1997. Vitamin and mineral intake of adults resident in an area of metropolitan S. Paulo, Brazil. *Journal of Public Health*. 31(2), 157-162.
34. Water Media Center. World Health Organization. Available in: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/>>.