

DIETA CONTENDO EXTRATO DAS OLIVEIRAS REDUZ NÍVEIS DE MERCÚRIO EM PEIXES EXPOSTOS AO MERCÚRIO

Alana Bianca de Moraes Chitolina¹; Aline Rossato²; Carolina Rapachi Fortes³;
Larissa da Silva Silveira⁴; Michele Rorato Sagrillo⁵; Liana da Silva Fernandes⁶;
Luiz Fernando Rodrigues Júnior⁷; Matheus Dellaméa Baldissera⁸

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se uma dieta contendo 180 mg/kg de extrato hidroalcoólico de *Olea europaea* pode reduzir a bioacumulação de mercúrio (Hg) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a 15 µg/L de cloreto de metilmercúrio (CH₃HgCl). Os níveis musculares de Hg foram significativamente maiores em peixes que receberam a dieta basal e expostos a CH₃HgCl em comparação aos peixes que receberam a dieta basal e não foram expostos a CH₃HgCl. Os níveis musculares de Hg foram significativamente menores em peixes que receberam a dieta contendo extrato hidroalcoólico de *O. europaea* e expostos a CH₃HgCl em comparação ao grupo que recebeu a dieta basal e expostos a CH₃HgCl, embora tenham permanecido diferente do grupo que recebeu a dieta basal e não foram expostos a CH₃HgCl. É possível concluir que essa concentração pode ser uma alternativa para redução dos níveis de Hg no filé de peixes.

Palavras-chave: *Olea europaea*; músculo; ração; saúde pública.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether a diet containing 180 mg/kg of hydroalcoholic extract of *Olea europaea* can reduce the bioaccumulation of mercury (Hg) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to 15 µg/L of methylmercuric chloride (CH₃HgCl). Muscle Hg levels were significantly higher in fish fed the basal diet and exposed to CH₃HgCl compared to fish fed the basal diet and not exposed to

¹ Alana Bianca de Moraes Chitolina- Discente do Curso de Biomedicina, UFN- alana.bianca@ufn.edu.br

² Aline Rossato – Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- aline.rossato@ufn.edu.br

³ Carolina Rapachi Fortes- Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- carolinarapachi@ufn.edu.br

⁴ Larissa da Silva Silveira- Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- larissa.silveira@ufn.edu.br

⁵ Michele Rorato Sagrillo- Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- sagrillomr@ufn.edu.br

⁶ Liana da Silva Fernandes- Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- liana@ufn.edu.br

⁷ Luiz Fernando Rodrigues Júnior- Docente do Programa de Pós-Graduação em Nanociências, UFN- luizrodrigues@ufn.edu.br

⁸ Matheus Dellaméa Baldissera- Docente do Curso de Biomedicina, UFN- matheus.dellamea@ufn.edu.br

CH₃HgCl. Muscle Hg levels were significantly lower in fish fed the diet containing the hydroalcoholic extract of *O. europaea* and exposed to CH₃HgCl compared to the group fed the basal diet and exposed to CH₃HgCl, although they remained different from the group fed the basal diet and not exposed to CH₃HgCl. It is possible to conclude that this concentration may be an alternative for reducing Hg levels in fish fillets.

Keywords: *Olea europaea*; muscle; feed; public health.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o peixe é considerado um alimento básico importante na dieta humana por ser uma fonte interessante de vitaminas, minerais, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, como o ômega-3 (OSMOND E COLOMBO, 2019; GRGEC, 2022), os quais são vistos como parte de uma dieta saudável, o que corrobora o crescente aumento do consumo de carne de peixe. A produção de peixes é o setor de produção animal que vem apresentando o maior índice de crescimento nas últimas décadas, justamente para suprir uma demanda crescente devido seus benefícios a saúde humana. Além disso, é importante enfatizar que o consumo global de peixes vem aumentando em uma taxa média anual de 3,1% de 1961 a 2017, o que é superior ao de todos os outros alimentos proteicos de origem animal. Por fim, é interessante ressaltar que o consumo *per capita* de peixe cresceu de 9,0 kg (peso vivo equivalente) em 1961 para 20,5 kg em 2018, ou seja, 1,5% ao ano (DOS SANTOS FILHO e DA BATISTA, 2009; ALÉXIS *et al.*, 2010). No entanto, os habitats de água doce também estão ameaçados por atividades humanas e mudanças ambientais, que resultaram em declínios substanciais na biodiversidade das águas nas últimas décadas (BUTCHART, 2010). Em meio às pressões humanas sobre os ecossistemas de água doce (incluindo captação de água, desvio, represamento e poluição), é esperado que a contaminação por mercúrio provinda de fontes antropogênicas se tornem cada vez mais importante neste cenário (PEREIRA *et al.*, 2019), o que acaba contaminando o filé do peixe e consequentemente o consumidor final do pescado, ou seja, o homem.

O mercúrio (Hg) é um contaminante global, persistente e bioacumulativo liberado no meio ambiente a partir de fontes de origem natural ou antropogênicas; sendo este último responsável por cerca de 80% do Hg ambiental (OBRIST *et al.*, 2018). O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta a maior

toxicidade, além de ser o único metal capaz de sofrer biomagnificação em quase todas as cadeias alimentares, isto é, sua concentração aumenta conforme aumenta o nível trófico da espécie (UNEP, 2002). Isso resulta em exposição ambiental via cadeia alimentar bastante alta para consumidores de níveis tróficos elevados, incluindo o homem. Além disso, o mercúrio é o único metal que reconhecidamente causou óbitos em humanos em razão de contaminação pela via ambiental, particularmente via ingestão de organismos aquáticos contaminados (BARKAY *et al.*, 2003; DOREA *et al.*, 2003), como os peixes.

Na Amazônia, nas duas últimas décadas do século passado, dificuldades socioeconômicas de países em desenvolvimento e um aumento dos preços internacionais do ouro levaram a uma verdadeira corrida do ouro em quase todos os países da bacia Amazônica. A amalgamação com Hg metálico era o processo utilizado na pré-concentração e extração do ouro. Como resultado, grandes quantidades de mercúrio foram lançadas nos principais rios e na atmosfera do ecossistema amazônico (LACERDA & SALOMONS, 1998; MALM, 1998). As altas concentrações de Hg encontradas no ecossistema amazônico foram, via de regra, atribuídas à mineração de ouro (NRIAGU, 1992) e à deposição de mercúrio de origem antrópica (HACON *et al.*, 1997; RAY e VASHISHTH, 2024).

Como consequência do aumento dos níveis de Hg na água, os peixes e outros organismos aquáticos são os mais afetados, sendo observado mortalidade, prejuízos imunológicos e antioxidantes, o que afeta a reprodução das espécies e acaba afetando o ecossistema como um todo (SOUZA *et al.*, 2019). Além disso, a bioacumulação do Hg em tecidos comestíveis, como o filé, é uma importante fonte de preocupação para a saúde humana (SOUZA *et al.*, 2019), uma vez que o Hg é um metal com potente efeito teratogênico e tóxico ao homem. Recente estudo publicado por Souza *et al.* (2019) revelou que carpas experimentalmente expostas a concentrações ambientalmente relevantes de Hg apresentaram prejuízos imunológicos, bem como acúmulo de Hg nos tecidos. Neste sentido, Baldissera *et al.* (2020) revelou que o uso de produtos naturais pode ser uma alternativa para evitar a mortalidade e acúmulo de Hg no filé. Neste sentido, surge a hipótese do uso do extrato aquoso da *Olea europaea*, árvore das oliveiras.

A *O. europaea* L. (oliveira) pertence à família Oleaceae, é uma das culturas mais antigas no mundo, concentrando sua maior produção na região do Mediterrâneo. Em 2018, a indústria do azeite teve uma produção mundial de 3,6 milhões de toneladas com alto impacto econômico em muitos países (PONTES *et al.*, 2022). No entanto, este impacto também afeta o meio ambiente, pois a produção de azeite gera uma grande quantidade de resíduos sólidos (folhas de oliveira e bagaço de azeitona). As folhas da oliveira são consideradas como resíduos do olival, que são descartadas em duas etapas: durante o processo de poda e como resultado da colheita mecânica do fruto da oliveira (ESPESO *et al.*, 2021). Devido a magnitude de produção, esse subproduto deve ser reaproveitado, promovendo a economia circular. A folha de oliveira tem sido usada na medicina tradicional, pois é uma fonte valiosa de compostos bioativos (ROMANI *et al.*, 2019).

Estudo conduzido por Necib *et al.* (2014) revelou que o azeite de oliva (2 mL/kg, via oral) foi capaz de aumentar o sistema de defesa antioxidante em ratos expostos ao cloreto de mercúrio, o que nos leva a crer que o extrato hidroalcoólico da *O. europaea* possa exercer efeito antioxidante, e consequentemente reduzir o acúmulo de Hg no filé de tilápias expostas a concentrações ambientalmente relevantes de Hg.

2. METODOLOGIA

Folhas verdes orgânicas de *O. europaea* (das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki) foram coletadas em um olival na localidade de Caçapava do Sul (Rio Grande do Sul, Brasil), os quais foram fornecidos pela empresa OLIV INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE AZEITES DE OLIVA LTDA, e um extrato hidroalcoólico foi preparado de acordo com a patente registrada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual sob número BR 10 2023 015892 7. Após isso, uma ração contendo todos os requisitos nutricionais para a tilápia foi produzida de acordo com o método descrito por Baldissera *et al.* (2020), onde foi adicionado o extrato hidroalcoólico na concentração de 180 mg/kg de ração, conforme sugerido por Sokooti *et al.* (2021). Após isso, 48 juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram adquiridas de piscicultores locais e acondicionadas em uma sala com temperatura adequada para a espécie (25-30 °C) durante 14 dias para aclimação e redução do estresse causado pelo transporte, e foram alimentadas com a ração basal (ração sem o extrato). Os peixes foram mantidos

em caixas d'água de 200 L, onde os seguintes parâmetros foram mantidos: temperatura a 27 °C, pH entre 6.2 e 6.5, e níveis de oxigênio entre 6.6 e 7.1 mg/L.

Após 14 dias, os peixes foram divididos em 4 grupos com 12 animais cada: grupo A (peixes alimentados com ração basal e não expostos ao Hg); grupo B (peixes alimentados com ração contendo 180 mg de extrato/kg de ração e não expostos ao Hg); grupo C (peixes alimentados com ração basal e expostos ao Hg); e grupo D (peixes alimentados com ração contendo 180 mg de extrato/kg de ração e expostos ao Hg). Os grupos A e C receberam a ração basal (sem extrato), ao passo que os grupos B e D receberam a dieta contendo 180 mg de extrato/kg de ração 45 dias, 2 vezes ao dia. Após 45 dias, os grupos C e D foram expostos ao Hg por 96 horas na concentração de 15 µg de cloreto de metilmercúrio/L água, conforme preconizado por Baldissera *et al.* (2020) em carpas.

Após isso, os animais foram eutanasiados com eugenol (150 µl/L) e o tecido muscular coletado para quantificação dos níveis de Hg. Os níveis de Hg foram mensurados utilizando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) de acordo o método descrito por Schmitt *et al.* (2013). Os dados foram avaliados quanto a normalidade e homogeneidade das variâncias, e uma análise de variância (ANOVA) paramétrica de duas vias foi utilizada considerando estatístico valores com $p < 0.05$. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Franciscana sob número 02/2023.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

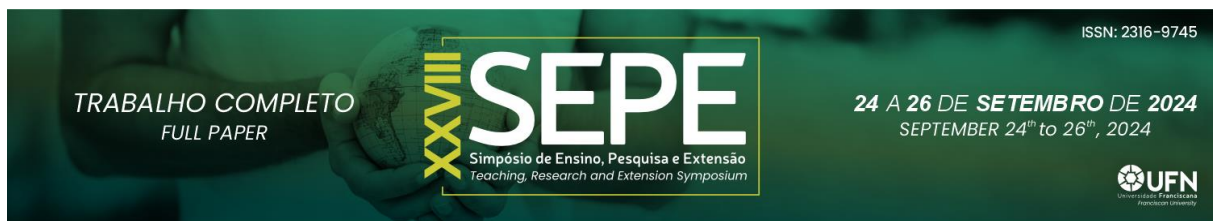
Os níveis musculares de Hg foram significativamente maiores em peixes que receberam a dieta basal e expostos a CH₃HgCl (grupo C) em comparação aos peixes que receberam a dieta basal e não foram expostos a CH₃HgCl (grupo A). A dieta contendo extrato hidroalcoólico de *O. europaea* para peixes não expostos a CH₃HgCl (grupo B) não afetou significativamente os níveis de Hg em comparação ao grupo A. Os níveis musculares de Hg foram significativamente menores em peixes que receberam a dieta contendo extrato hidroalcoólico de *O. europaea* e expostos a CH₃HgCl (grupo D) em comparação ao grupo C, embora tenham permanecido diferentes do grupo A.

A identificação da bioacumulação após a exposição ao Hg é um indicador adequado para monitorar e avaliar os efeitos de substâncias tóxicas em peixes (CHOI *et al.*, 2023). Como esperado, um aumento significativo nos níveis de Hg foi observado no músculo da tilápia do Nilo, como já observado por Ren *et al.* (2020) no músculo do linguado (*Paralichthys olivaceus*). Em geral, a afinidade do Hg pelos músculos é menor, pois é um local para armazenar energia e realizar várias ações relacionadas a diferentes funcionalidades, em vez de um local para realizar reações metabólicas. Embora presente em concentrações mais baixas no músculo em comparação com outros tecidos, a bioacumulação no músculo representa uma preocupação importante devido à conexão entre a cadeia alimentar e a bioacumulação de Hg, destacando a consequente transferência de Hg para os humanos (RAY e VASHISHTH, 2024). O uso de uma dieta contendo 180 mg de extrato hidroalcoólico de *O. europaea*/kg de dieta por 45 dias foi capaz de reduzir a bioacumulação de Hg no músculo da tilápia do Nilo em comparação à ração para peixes com dieta basal (sem suplementação), o que pode representar uma abordagem interessante para reduzir o conteúdo desse metal no filé de peixe. No melhor de nosso conhecimento, não existem relatos sobre os efeitos de *O. europaea* nos níveis de Hg, mas várias evidências sugerem a melhora no estado antioxidante provocada por polifenóis na redução da bioacumulação de Hg (LIU *et al.*, 2017; ABUBAKAR *et al.*, 2024).

De acordo com Liu *et al.* (2017) um pré-tratamento com 100 mg/kg de curcumina por dia via intraperitoneal foi capaz de reduzir a bioacumulação hepática de Hg em ratos Wistar expostos a 2,4 mg/kg de HgCl₂, concluindo que a melhora no sistema antioxidante hepático por meio de efeitos protetores nas atividades hepáticas de CAT, SOD e GPx é uma via ligada à redução do conteúdo de Hg neste tecido. Em ratos, Caglayan *et al.* (2019) revelaram que o tratamento com 100 mg de rutina/kg de peso corporal por 7 dias exerceu efeitos nefroprotetores devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em ratos expostos a 1,23 mg/kg de HgCl₂, uma condição que reduziu o conteúdo de Hg no tecido renal.

4. CONCLUSÃO

Com isso, é possível concluir que o extrato testado na concentração de 180 mg/kg de dieta pode ser uma alternativa interessante para redução dos níveis de Hg



no filé de peixes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Franciscana (UFN).

REFERÊNCIAS

- ALÉXIS. S, *et al.* effect of density stocking on the growth of matrinxã *B. amazonicus* in small cages. **Revista Brasileira de Engenharia e Pesca**, v. 1, p. 81-92, 2010.
- ABUBAKAR MG, *et al.* Flavonoids of *Phoenix dactylifera* L. ameliorates mercury-toxicity on the kidney of Wistar rats. A biochemical, morphological and molecular approach. **Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine** 10, 100392, 2024.
- BALDISSERA MD. *et al.* Behavioral impairment and neurotoxic responses of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to organophosphate pesticide trichlorfon: Protective effects of diet containing rutin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 239, p. 108-871.
- BARKAY, T. *et al.* Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, v.27, p. 355-84, 2003.
- BUTCHART, S. H. M. *et al.* Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. **Science**, v. 328, p. 1164 -1168, 2010.
- CAGLAYAN C, *et al.* Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 54, 69-78, 2019.
- DOREA, J. G. *et al.* Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v.13, p. 239-48, 2003.
- DOS SANTOS FILHO, L. C.; DA BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (characidae) na Amazônia central. **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 195–203, 2009.



ESPESO, J. *et al.* Olive leaf waste management. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 2021.

GRGEC, A. S. Potential risks and health benefits of fish in the diet during the childbearing period: Focus on trace elements and n-3 fatty acid content in commonly consumed fish species from the Adriatic Sea. **Environmental Advances**, v. 8, n. 100226, p. 100-226, 2022.

HACON, S. *et al.* Risk assessment of mercury in Alta Floresta, Amazon Basin-Brazil. **Water, Air, Soil Pollution**, v.97, p.91-105, 1997.

LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. Mercury from gold and silver mining A chemical time bomb? Berlin: **Springer Verlag**, 1998.

LIU W, *et al.* Protective effects of curcumin against mercury-induced hepatic injuries in rats, involvement of oxidative stress antagonism, and Nrf2-ARE pathway activation. **Human and Environmental Toxicology** 36, 949-966, 2017.

MALM, O. Goldmining as a source of Mercury exposure in the Brazilian Amazon **Environmental Research**, v.77, p. 73-78, 1998.

NECIB, *et al.* Protective Effect of Virgin Olive Oil (*Olea europea* L.) Against Oxidative Damage Induced by Mercuric Chloride in Rat *Albinos Wistar*. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry** 10, p. 45-58, 2014.

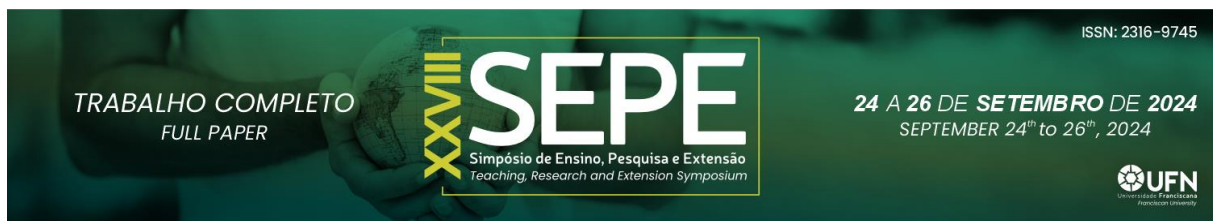
NRIAGU, J. O. *et al.* Mercury pollution in Brazil. **Nature**, v.356, p. 389, 1992.

OBRIST, D. *et al.* A review of global environmental mercury processes in response to human and natural perturbations: changes of emissions, climate, and land use. **Ambio**. 47, p. 116–140, 2018.

OSMOND, A.T.Y; and COLOMB, C. S. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. **Journal of World Aquaculture Society** p. 490-509, 2019.

PEREIRA P, *et al.* A multidimensional concept for mercury neuronal and sensory toxicity in fish - From toxicokinetics and biochemistry to morphometry and behavior. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects** 1863, 129298, 2019.

PONTES, A.V.P. *et al.* Extraction optimization, biological activities, and application in O/W emulsion of deep eutectic solvents-based phenolic extracts from olive pomace. **Food Research International**, v. 161, p. 1-14, 2022.



RAY S, VASHISHTH R. From water to plate: Reviewing the bioaccumulation of heavy metals in fish and unraveling human health risks in the food chain. **Emerging Contaminants** 10, 100358, 2024.

REN Z, et al., Tissue-Specific Accumulation and Antioxidant Defenses in Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Juveniles Experimentally Exposed to Methylmercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 79, 406-420, 2020

ROMANI, A. et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1-33, 2019.

SCHMITT, C. et al. Comparative analyses of the neurobehavioral, molecular, and enzymatic effects of organophosphates on embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology** 73, p. 67–75, 2019.

SOKOOTI, R. et al. Effects of olive leaf extract (I Leecino) on growth, haematological parameters, immune system and carcass composition in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Research** 52, 2415-2423, 2021

SOUZA, et al. Diphenyl diselenide dietary supplementation protects against methylmercury-chloride-induced immunotoxicity in the head kidney and spleen of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) via regulation of purinergic signaling and the NLRP3 inflammasome. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 222, p. 59-64, 2019.

UNEP - United Nations Environment Program. Chemicals: Global Mercury Assessment Geneva, 2002.

VIANNA, A.S. et al. Human exposure to mercury and its hematological effects: a systematic review. **Reports in Public Health** v. 35, e00091618, 2019.