

# AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DO ANTI-INFLAMATÓRIO ESTEROIDAL PREDNISONA PARA *ENCHYTRAEUS CRYPTICUS*, E SEMENTES *ERUCA VESICARIA* E *TRITICUM AESTIVUM L.*

Palavras-Chave: ECOTOXICIDADE, FÁRMACOS, SOLO

Autoras:

ISABELLE NOGUEIRA BALIEIRO DA SILVA, FT – UNICAMP  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARTA SIVIERO GUILHERME PIRES, FT – UNICAMP

## 1. INTRODUÇÃO:

Os poluentes emergentes são compostos que foram introduzidos recentemente no meio ambiente, ou que seus impactos são pouco conhecidos. A maioria das estações de tratamento de água e esgoto não são capazes de remover esses compostos, e o fato de não estarem inclusos na legislação também representa um problema, uma vez que não há limites máximos estabelecidos para a sua presença nos corpos d'água. Portanto, o estudo destes compostos e a sua regulamentação são de extrema importância para minimizar seus impactos negativos no meio ambiente (Kumar; Mohapatra; Weber, 2023).

A prednisona é um anti-inflamatório esteroide com estrutura semelhante ao cortisol (Toehwé; Prado; Rocha, 2017; Choudhury et al., 2021). Como muitos outros fármacos, há preocupações com relação à sua ecotoxicidade, já que foi determinado a ocorrência do medicamento em corpos hídricos (Santos et al., 2020).

Além disso a presença desses compostos em corpos hídricos também indica a possibilidade da sua presença em solo, devido ao uso de águas residuárias para a irrigação e do lodo de esgoto para a adubação (Gworek et al., 2021). Nesse contexto Zhang et al. constataram a presença do Prednisolona, metabólito ativo do prednisona, em águas residuárias de duas fazendas de suínos na China.

Neste contexto os bioensaios se mostram ferramentas vantajosas para a determinação de toxicidade, pois a sensibilidade destes organismos às mudanças ambientais, os torna capazes de fornecer medidas diretas da toxidade (Kumar; Mohapatra;

Weber, 2023). Além disso, possuem um baixo custo e fácil execução (Guerin, 2022).

Trabalhos como o de Pawłowska, Telesinski e Biczak (2021) foram conduzidos com o intuito de avaliar a toxicidade do anti-inflamatório diclofenaco utilizando sementes de *Hordeum vulgare L.* (cevada). O estudo constatou que o efeito do medicamento no potencial de germinação foi mínimo, sendo possível observar efeitos apenas nas concentrações de 100 mg kg<sup>-1</sup> e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, no entanto houve diminuição no crescimento da raiz. Zezulka et al. (2019) também estudaram a fitotoxicidade do diclofenaco, em seus ensaios demonstraram que o diclofenaco não interferiu na germinação da cebola, da alface, do tomate e da ervilha, porém afetou a germinação do milho.

Com relação aos bioensaios utilizando o *E. crypticus*, foram desenvolvidos estudos para avaliar os efeitos na sua sobrevivência e reprodução quando expostos ao medicamento anti-histamínico Difenidramina. O estudo concluiu que não foram observadas diferenças na sobrevivência e na reprodução do organismo quando expostos as concentrações de 10 mg kg<sup>-1</sup> e 50 mg kg<sup>-1</sup> do medicamento (Mendes et al., 2022).

Portanto, o objetivo deste projeto de iniciação científica é avaliar a toxicidade do anti-inflamatório Prednisona no organismo do solo *Enchytraeus crypticus*, por meio dos testes de fuga e de reprodução, e nas sementes das espécies *Eruca vesicaria* (rúcula) e *Triticum aestivum L.* (trigo), por meio do teste de taxa de germinação e crescimento de raiz, com o intuito de avaliar a ecotoxicidade do medicamento.

## 2. OBJETIVOS:

Este projeto tem por objetivo avaliar a toxicidade do anti-inflamatório esteroide Prednisona por meio de testes ecotoxicológicos com organismo do solo e sementes. Além disso os resultados obtidos por meio do teste de semente também serão utilizados para analisar a diferença de sensibilidade das sementes ao composto.

## 3. METODOLOGIA:

### 3.1. Testes com sementes

O teste de toxicidade de alongamento de raiz e germinação de semente foi realizado em placa Petri com papel filtro. Foram adicionados 4 ml de solução e as sementes. As placas de Petri foram posicionadas de forma aleatória e mantidas no escuro em  $18 \pm 2$  °C por 5 dias. O teste foi realizado com 5 concentrações e o controle em triplicata com 20 sementes em cada placa. Ao final dos testes o número de sementes que germinaram foi contado e os comprimentos das raízes medidos (EPA, 1996).

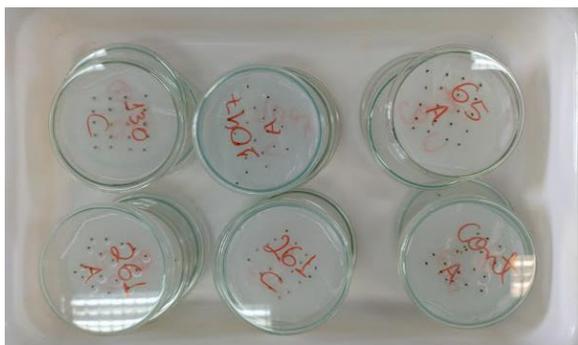


Figura 1: Montagem do teste de semente

Foi desenvolvido um teste preliminar para determinar as concentrações estudadas, com fator de progressão igual a 10, na qual a última concentração analisada é a concentração de saturação do composto. O valor de CE50 obtido foi utilizado para determinar as concentrações definitivas estudadas, com fator de progressão igual a 2. (Environmental Protection Agency, 1996).

O teste definitivo foi realizado com o objetivo de traçar a curva concentração-resposta, o CE10 e o CE50 para a germinação da semente e crescimento da raiz (EPA, 1996).

A princípio, foi proposto para este projeto a utilização das sementes de *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Brassica rapa* L. (nabo), no entanto, a semente de nabo foi substituída pela semente de *Eruca vesicaria* (Rúcula), que também é dicotiledônea e cumpre os requisitos de escolha da OPPTS 850.4200 (1996).

### 3.2. Testes com organismo *E.crypticus*

Foi realizado o teste de fuga conforme a Norma ABNT 17512-1:2011: *Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento - Parte 1: Ensaio com minhocas* para a avaliação da função habitat do solo.

O teste foi desenvolvido com 5 réplicas para cada concentração e controle. A montagem do ensaio foi desenvolvida dividindo um recipiente em duas partes iguais por uma divisória introduzida verticalmente. Os recipientes foram preenchidos com 30g de solo artificial, composto de 75% de areia, 25% de caulim e 5% de fibra de coco. Uma das metades foi preenchida com solo-teste e a outra metade com solo-controle. O separador foi removido e 10 organismos foram colocados na linha da divisória. Os recipientes foram tampados com uma tampa transparente perfurada e incubados em uma temperatura de  $(20 \pm 2)$  °C (ABNT, 2011).



Figura 2: Montagem do teste de fuga

Após 48 horas, o solo-controle e o solo-teste foram separados novamente pela divisória e foram adicionados o álcool e o corante rosa bengala. Após 48h o número de organismos foi contado (ABNT, 2011).

O ensaio de reprodução foi realizado conforme a Norma ABNT 16387:2012: *Qualidade do solo — Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) — Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência*. O ensaio foi desenvolvido com 5 tratamentos e controle, os tratamentos foram feitos com 5 réplicas e o controle com 8.

Um recipiente foi preenchido com 30g de solo artificial, e foram dispostos 10 organismos adultos em cada recipiente. Ao finalizar a montagem dos testes os recipientes foram incubados em uma temperatura  $(20 \pm 2)$  °C por 21 dias. Ao encerrar esse período, os espécimes juvenis foram corados com rosa de bengala e contados (NIVA; BROWN, 2019; ABNT, 2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos por meio dos testes de alongamento de raiz podem ser observados na Tabela 1, onde estão apresentados o CENO, CEO, CE10 e CE50 encontrados.

Para a análise dos resultados foi realizado o Teste de Grubbs como parâmetro para a eliminação de outliers.

O teste de determinação de intervalo desenvolvido com a semente de trigo indicou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) por meio do método ANOVA e por meio do Teste de Dunnett apresentou diferença estatística entre o controle e os tratamentos com exceção da concentração 0,45 mg PRED.L<sup>-1</sup>. Já o teste realizado com a semente de rúcula apresentou diferença estatística entre os tratamentos e o controle, com exceção das concentrações 0,45 e 4,5. Os efeitos podem ser observados no Gráfico 1.

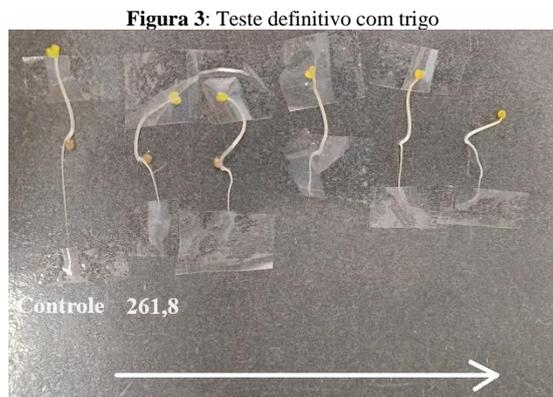
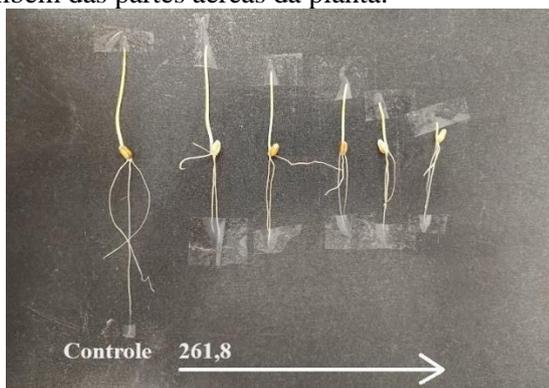
**Tabela 1** – Inibição de germinação

| Semente                          | CENO   | CEO     | CE10 | CE50    |
|----------------------------------|--------|---------|------|---------|
| mg. L <sup>-1</sup> de água      |        |         |      |         |
| <b>Determinação de intervalo</b> |        |         |      |         |
| <b>Trigo</b>                     | 0,45   | 4,5     | 0,15 | 352,4   |
| <b>Rúcula</b>                    | 4,5    | 45      | 6,89 | 525,97  |
| <b>Definitivo</b>                |        |         |      |         |
| <b>Trigo</b>                     | 523,63 | 1047,25 | -    | 1989,03 |
| <b>Rúcula</b>                    | 261,81 | 523,625 | -    | -       |

No teste definitivo realizado com o trigo foi constatado diferença estatística entre o controle e os tratamentos, com exceção de 261,81 e 523,63 mg PRED L<sup>-1</sup>. No entanto entre os tratamentos apenas foi observado diferença estatística entre 4189 e 523,63 mg PRED L<sup>-1</sup>.

Já a semente de rúcula apresentou diferença estatística significativa entre o controle e os tratamentos, com exceção de 261,81. E não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Nas figuras 3 e 4 são apresentadas amostras das plântulas desenvolvidas durante o teste definitivo em ordem crescente de concentração. Por meio destas figuras é possível notar a inibição não só da raiz, mas também das partes aéreas da planta.

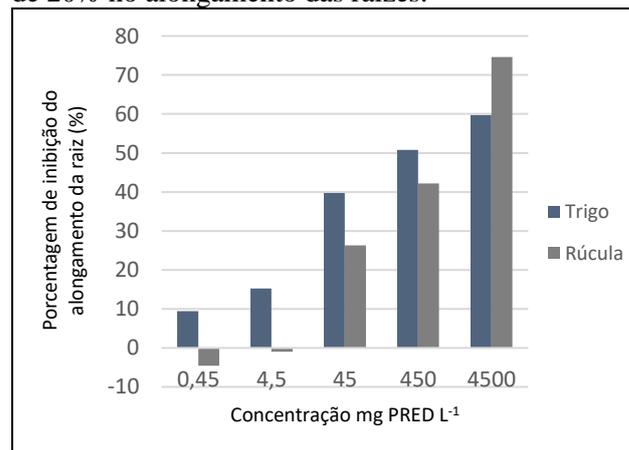


**Figura 3:** Teste definitivo com trigo

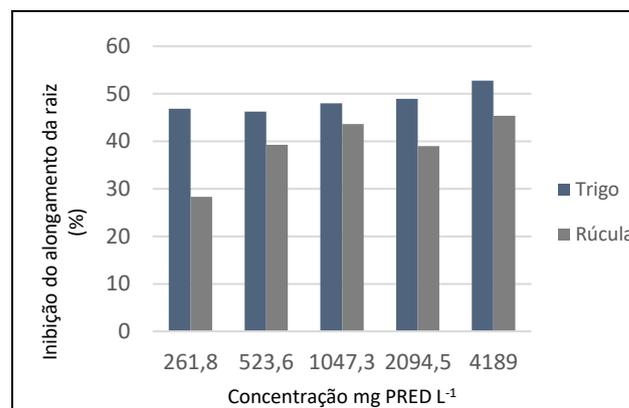
**Figura 4:** Teste definitivo com rúculai

Tanto no teste definitivo realizado com a rúcula quanto no teste realizado com o trigo não foi possível calcular o CE10 de ambos os testes e o CE50 do teste realizado com a rúcula, pois apresentaram erro padrão elevado.

É relevante ressaltar que em baixas concentrações (0,45 e 4,5 mg PRED L<sup>-1</sup>) foi observado um efeito “estimulante” no alongamento das raízes da rúcula, porém, a partir da concentração 45 mg PRED L<sup>-1</sup> houve um efeito inibitório de mais de 20% no alongamento das raízes.



**Gráfico 1:** PIAR teste de determinação de intervalo



**Gráfico 2:** PIAR teste definitivo

Com relação a inibição de germinação constatou-se, com grau de confiança de 95%, que a semente de rúcula apresentou diferença estatística significativa com o controle nas concentrações 45 e 4500 mg PRED L<sup>-1</sup>. Esses tratamentos também

apresentaram diferença significativa com 0,45 mg PRED L<sup>-1</sup>. Já a semente de Trigo não apresentou inibição significativa, com valores de inibição abaixo de 2%.

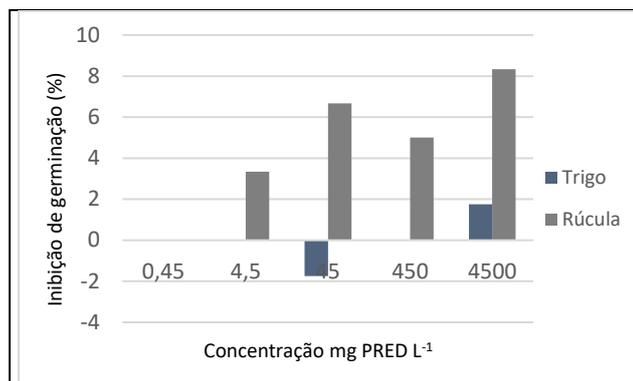


Gráfico 1: IGR teste de determinação de intervalo

No teste definitivo a semente de trigo também não apresentou valores significativos de inibição. Já a semente de rúcula apresentou diferença estatística com o controle apenas para 4189 mg PRED L<sup>-1</sup>. Essa concentração também apresentou diferença estatística com 2094,5 mg PRED L<sup>-1</sup>.

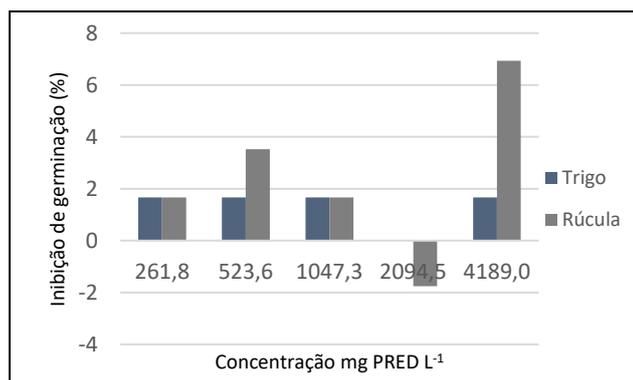


Gráfico 2: IGR teste definitivo

Ao comparar os valores de CENO, CEO e CE50 do teste de determinação de intervalo é possível notar que a semente de trigo apresentou maior sensibilidade para o fármaco que a de rúcula. Apesar dos valores de CENO e CEO do teste definitivo indicarem para uma maior sensibilidade da semente de rúcula, a porcentagem de inibição do alongamento da raiz da semente de trigo foram significativamente maiores.

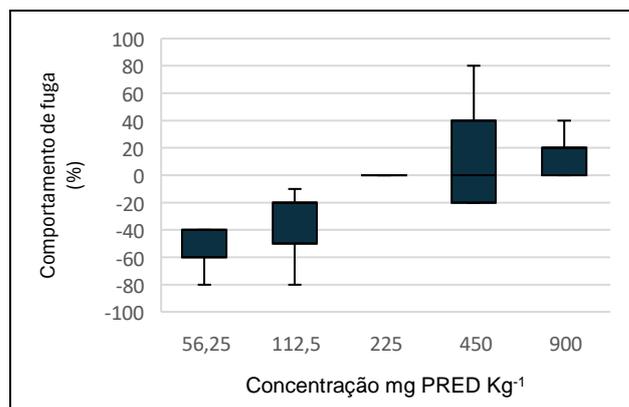


Gráfico 2: Teste de fuga

O teste de fuga não apresentou diferença estatística significativa. Apresentando um  $p > 0,05$  no teste de Kruskal Wallis.

Os resultados do teste de reprodução ainda estão sendo finalizados.

## Conclusão

Os testes de fitotoxicidade realizados com as sementes de trigo e rúcula apontam que o anti-inflamatório Prednisona induz efeito fitotóxico nas sementes. Além disso, indicam que em valores baixos é possível que o medicamento cause um efeito estimulante nas sementes. E que sementes monocotiledôneas e dicotiledôneas apresentam sensibilidade diferente ao medicamento.

## BIBLIOGRAFIA

- Associação Brasileira De Normas Técnicas. **NBR ISO 17512-1**: Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento - Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). 2011.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 16387:2012**: Qualidade do solo — Efeitos de poluentes em *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) — Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. 2012.
- Choudhury, Sirazum et al. The use of prednisolone versus dual-release hydrocortisone in the treatment of hypoadrenalism. **Endocrine connections**, v. 10, n. 2, p. R66-R76, 2021.
- Environmental Protection Agency. **OPPTS 850.4200**: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. 1996.
- Guerin, T. F. **Phytotoxicity complements chemical assessment for re-use and re-purposing of refinery wastes for soil amendment purposes after**

**bioremediation.** Journal of Environmental Management, 2022. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115257>>. Acesso em: 15 fev. 2023.

Gworek, B. et al. Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. **Water Air Soil Pollut**, v.232, n.145, 2021. Disponível em:<<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>> Acesso em: 9 dez. 2023

Kumar, M; Mohapatra, S; Weber, K. **Emerging Aquatic Contaminants.** Elsevier, 2023. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323960021000055>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

Toehwé, L. H.; Prado, L. D.; Rocha, H. V. A. **Prednisone raw material characterization and formulation development.** São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000400088>>. Acesso em: 02 maio. 2023.

Mendes, L. A. et al. **Co-Exposure of Nanopolystyrene and Other Environmental Contaminants—Their Toxic Effects on the Survival and Reproduction of Enchytraeus crypticus.** *Toxics*, v. 10, abr. 2022. Disponível em:<<https://doi.org/10.3390/toxics10040193>>. Acesso em: 09 maio. 2023.

Pawłowska, B.; Telesinski, A.; Biczak, R. **Effect of diclofenac and naproxen and their mixture on spring barley seedlings and Heterocypris incongruens.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 88, nov. 2021. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103746>>. Acesso em: 08 maio. 2023.

Santos, A.V. et al. **Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in brazil.** *Science of The Total Environment*, v. 746, dez. 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141011>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

Zhang, Jin-Na et al. **Occurrence and fate of androgens, progestogens and glucocorticoids in two swine farms with integrated wastewater treatment systems.** *Water Research*, v. 192, p. 116836, 2021.

Zezulka, Š. et al. **Sensitivity of physiological and biochemical endpoints in early ontogenetic stages of crops under diclofenac and paracetamol treatments.** *Environmental Science and Pollution Research* v. 26, p. 3965–3979, 2019. Disponível em:<

<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3930-x>>. Acesso em: 08 maio. 2023.