



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS
IFG CAMPUS GOIÂNIA

Marco Túlio Ramos Serrano

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR HORMÔNIO EM MATRIZ
BIOLÓGICA**

Goiânia, 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS
IFG CAMPUS GOIÂNIA

Marco Túlio Ramos Serrano

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR HORMÔNIO EM MATRIZ
BIOLÓGICA**

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em
Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG
(PPGTPS- IFG) - Dissertação de Mestrado
Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de
Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa:
Fontes alternativas de água

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schimidt
Co-Orientadora: Simone Maria Teixeira Sabóia-
Morais

Goiânia, 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS
IFG CAMPUS GOIÂNIA

Marco Túlio Ramos Serrano

Avaliação da qualidade de ambiente aquático contaminado com hormônio sintético feminino
utilizado como repositores hormonal

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em
Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG
(PPGTPS- IFG) - Dissertação de Mestrado
Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de
Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa:
Fontes Alternativas de Águas.

Professor Doutor, Fernando Schimidt, Instituto Federal de Goiás

Professora Doutora, Simone Maria Teixeira Sabóia-Morais, Universidade Federal de
Goiás

Professora Doutora, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, Universidade Federal de
Goiás

Aprovado em: ___/___/___

DEDICATÓRIA

Dedico esta elaboração a todos os que me apoiaram e me incentivaram na busca de dias melhores. Família, amigos e gestores que acreditaram na busca pelo meu crescimento intelectual, independente da área, cargo ou função.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu uma mente em que pude trabalhar e aperfeiçoar. Que sempre me guiou pelos caminhos de luz, me protegeu de todas as tempestades e me livrou de toda enfermidade.

Agradeço a minha mãezinha que me deu vida por sua vida, me motivou a buscar o sucesso e sempre foi minha incansável luz, que sempre me cuidou e me guardou.

Agradeço aos meus tantos amigos que sempre se orgulharam de mim e de minha companhia.

Agradeço a Renata Santos Ribeiro e Paulo Roberto Pelágio pela tão honrosa companhia. Agradeço também a Wiebke Bille Knüppel Pretto pela força nos últimos minutos de escrita da dissertação e a Camila Alonso por sempre insistir em me convencer de que eu era bom, de que eu era capaz.

Agradeço aos meus professores Fernando Schimidt e Simone Maria Teixeira Saboia-Morais pela paciência e disposição.

Agradeço aos alunos (Carol de Almeida Jansen, Guilherme Carneiro e Suzy Taeko Mitsuzono) do Laboratório de Comportamento Celular, localizado na Universidade Federal de Goiás que me receberam de braços abertos, me apoiaram e me suportaram em todas as etapas da pesquisa.

Agradeço ao aluno de Iniciação Científica Edilson Ribeiro de Oliveira Júnior e a Professora Doutora Kennia Rocha Rezende responsável pelo laboratório de Farmacocinética da Universidade Federal de Goiás que me cederam equipamentos para os estudos e me auxiliaram na geração de resultados.

Agradeço também ao Programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis do Instituto Federal de Goiás e a CAPES pela oportunidade.

Agradeço as Industriais Brainfarma e Cifarma Científica pela disponibilização de horários e materiais para minha pesquisa.

Muito obrigado!

Avaliação da contaminação da água por hormônio em matriz biológica

Autor: Marco Túlio Ramos Serrano

Orientador: Professor Doutor Fernando Schmidt

Coorientador: Professora Doutora Simone Maria Teixeira Sabóia-Morais

RESUMO

Nos últimos anos, o meio ambiente tem se tornado o centro e o alvo de muitas discussões das quais estas se referem a destruição de florestas, a extinção da vida animal e a contaminação e esgotamento das águas. O aumento descontrolado da população e das grandes cidades, aliados ao descaso de líderes e governantes agravam ainda mais a situação do meio ambiente, especificamente os rios que estão sendo cruelmente destruídos pelo grande volume de efluentes domésticos e industriais que são indiscriminadamente despejados nestes corpos de água sem qualquer tratamento ou controle. Junto a modernidade surgem os micropoluentes, ou também os chamados de poluentes emergentes que são caracterizados como compostos químicos ou biológicos que possuem grande poder de contaminação em pequenas concentrações. O disruptores endócrinos aparecem com uma importância significativa uma vez que podem desencadear alterações metabólicas, comportamentais e morfológicas nos animais. Carregam uma potência de contaminação na ordem de $\mu\text{g/L}$ e até ng/L . Participam do grupo de disruptores endócrinos os hormônios, utilizados largamente em mulheres como métodos contraceptivos para reposição hormonal entre outras fontes que podem ser de origem antrópica ou natural. A Tibolona é um hormônio sintético praticamente insolúvel em água quando pura e possui alta atividade biológica quando diluída em etanol, é indicado como repositor hormonal em mulheres que estão na menopausa, oferece diversas vantagens e proteção à saúde da mulher e da mesma forma é um potente poluente emergente. Utilizando método de cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível avaliar a curva da disponibilidade da molécula em água e afirmar que a molécula permanece sem degradação por até 5 dias em ambiente de temperatura de 25 a 30°C com e sem presença de luz. Para avaliação de toxicidade da molécula em ambiente aquático foi utilizado biomonitor (*P. reticulata*) expostos por 5 dias ao hormônio e dessa maneira através de observações foi possível avaliar as variações de comportamento dos diferentes grupos expostos e determinar em água potável a concentração letal para ambos os sexos. A Tibolona tem a capacidade de interferir no comportamento de um grupo que pode até mesmo se autodestruir ou diminuir sua reprodução afetando a vida aquática e conseqüentemente alterando outros ecossistemas.

PALAVRAS-CHAVE: *POECILIA RETICULATA*, POLUENTES EMERGENTES, TIBOLONA, DISRUPTOR ENDÓCRINO

Water contamination assessment by hormone in biological matrix

Author: Marco Túlio Ramos serrano

Adviser: Doctor Teacher Fernando Schimidt

Co-adviser: Doctor Teacher Simone Maria Teixeira Sabóia-Morais

ABSTRACT

In recent years, the environment has become the center and the subject of many discussions of which they refer the destruction of forests, the extinction of animal life and contamination and depletion of water. Uncontrolled population growth and major cities, combined with the indifference of leaders and governments to further aggravate the state of the environment, specifically the rivers being cruelly destroyed by the sheer volume of domestic and industrial effluents that are dumped indiscriminately in these water bodies without any treatment or control. Along modernity arise micropollutants, or also called emerging pollutants that are characterized as chemical or biological compounds that have great power of contamination in small concentrations. These micropollutants can be pesticide residues, industrial waste and pharmaceuticals. The EDs appear to be of significant importance since it may trigger metabolic, morphological and behavioral changes in animals. Carry a contamination of power in order $\mu\text{g/L}$ and even ng/L . Join the group of endocrine disruptors hormones, widely used in women as contraception for hormone replacement among other sources that may be of anthropogenic or natural origin. Tibolone is a synthetic hormone practically insoluble in water when pure and has high biological activity when diluted in ethanol, is indicated as replenishing hormone in women who are in menopause, offers several advantages and protection of women's health and likewise is a potent emerging pollutant. Using liquid chromatography of high efficiency, it was possible to evaluate the curve of the availability of water in the molecule and state that the molecule remains without gradation, up to 5 days at room temperature 25 to 30 ° C with and without the presence of light. To assess toxicity of the molecule in water environment was used biomo-nitores (*P. reticulata*) exposed for 5 days to the hormone and thus through observations was possible to evaluate the behavior of deviation of the exposed groups and deter-nar in drinking water concentration lethal to both sexes. The influence of the molecule in the fish have the ability to interfere with the re-production system and the behavior of a group which can even destroy itself or diminish your affecting aquatic life and thus altering other ecosystems.

KEYWORDS : POECILIA RETICULATA, TIBOLONE, EMERGING POLLUTANT,
DISRUPTOR ENDOCRINE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	13
AVALIAR SE O HORMÔNIO SINTÉTICO FEMININO TIBOLONA EXERCE INFLUÊNCIA NO AMBIENTE AQUÁTICO EM QUE ELA É INSERIDA POR MEIOS DE OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS DOS ANIMAIS REALIZANDO EXPOSIÇÕES EM CONCENTRAÇÕES CADA VEZ MENORES A FIM DE DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO LETAL PARA AMBOS OS SEXOS.....	13
AVALIAR A INTERAÇÃO DA MOLÉCULA DA TIBOLONA NA ÁGUA DE RIO E VERIFICAR SE EXISTE DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DA TIBOLONA POR MÉTODOS ANALÍTICOS.....	13
2CAPÍTULO I	14
3MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5CONCLUSÃO.....	32
6SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	32
7REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Os rios são recursos sensíveis e de difícil renovação, fornecem aos seres humanos, de forma limitada diversas aplicações e usos como água potável, uso na irrigação, navegação, recreação, produção de energia elétrica, em processos industriais e entre vários outros benefícios como resfriamento e higienização. Estas atividades, muitas vezes, conduzidas ou induzidas pelo homem influenciam ou contribuem significativamente para redução da qualidade e da quantidade de água disponível, o que pode também, influenciar no equilíbrio da vida aquática, aumentando a quantidade de algumas espécies e diminuindo outras (SCHIAVINI, 2011)

Nos últimos anos, as discussões ambientais estão sempre ou quase sempre ligadas a qualidade da água. O imenso volume de descarte de efluentes industriais e esgotos domésticos nos rios, o desmatamento de matas ciliares, o crescimento de espécies vegetais não nativas, trazem de forma indiscriminada, uma quantidade enorme de micropoluentes que mesmo em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ a ng/L causam efeitos devastadores em grande parte da vida aquática incluindo animais e vegetais que se utilizam destas fontes de alimentação (BILLA, 2007).

A preocupação com esses poluentes emergentes cresce a cada dia, principalmente quando estão relacionados a desreguladores endócrinos, onde os hormônios estão inclusos, os quais podem ser de origem antrópica ou natural. Ainda hoje, não existe um consenso para definir o que é um disruptor endócrino, porém o censo comum é que um disruptor endócrino é aquela substância que tem o poder de alterar o sistema endócrino do ser vivo contaminado (GHISELLI & JARDIM, 2007).

A Tibolona faz parte deste grupo de micropoluentes emergentes, ela é um hormônio sintético e tem ações e funções semelhantes a outros hormônios como etinilestradiol e gestodeno. A sua semelhança com outros hormônios é estendida quando falamos de impactos ambientais. Da mesma forma que atua também pode causar efeitos indesejáveis quando despejados em rios e tem grande possibilidade de se tornar uma ameaça principalmente para os peixes que serão expostos e conseqüentemente para outros animais que sobrevivem daquele ecossistema contaminado (RYMER, 2002).

Mesmo com todos estes malefícios ambientais, a Tibolona recebe um especial tratamento para conforto de mulheres na menopausa e pós-menopausa. Estudos apontam que

diversos fatores entre eles socioeconômicos, as mulheres começam a enfrentar os dolorosos e agonizantes sintomas da menopausa a partir dos 28 anos de idade, a idade mais jovem já relatada e podendo também surgir até os 51 anos, a idade mais avançada. Estatisticamente, as mulheres que utilizaram métodos anticoncepcionais ou algum tratamento hormonal começaram a sofrer os efeitos da menopausa com idade menores que aquelas mulheres que nunca tinham utilizado nenhum método contraceptivo (PEDRO et al, 2003).

Efeitos como ressecamento vaginal, ondas intensas de calor que se repetem de duas três vezes ao dia, mal estar, falta de ar e perda de massa óssea são alguns dos sintomas mais reclamados e de maior impacto na qualidade de vida das mulheres (PEDRO et al, 2003).

O volume crescente de uso deste repositor hormonal adicionado ao falho tratamento de esgoto domésticos e efluentes industriais, contribuem para o despejo dessa substância, não metabolizada, no meio ambiente. Os rios e mananciais recebem esses materiais, contaminando todo o curso ou volume de reservatório (BILA, 2007).

O desenvolvimento de doenças como câncer em vários órgãos que estão relacionados com sistema sexual como a mama, ovário, útero e próstata, a anormalidade do crescimento e desenvolvimento sexual, a diminuição, parcial ou total da fertilidade masculina, distúrbios de fertilização e gravidez anormal são relacionadas à exposição aos desreguladores endócrinos. Não só com os homens, mas principalmente com animais que estão em constante exposição direta com estas substâncias, o potencial de desregular a reprodução e desenvolvimento destes animais é ainda maior, podendo levar a esterilização ou redução da população (SCHIAVINI, et al, 2011).

SCHIAVINI apud STUART et al, 2004, que aponta uma redução para a reprodução dos anfíbios no mundo, onde 32% da população estão ameaçadas sem uma verdadeira causa conhecida e alguns dos fatores apontados incluem os poluentes químicos (xenobióticos) agindo isoladamente ou, ainda, em associação com outros fatores, que incluem modificação e destruição do habitats. Os motivos que levaram a essa pesquisa foram:

- Se existe risco da presença da Tibolona no meio ambiente aquático;
 - Se os animais sofrem algum impacto quando expostos a este contaminante;
 - Se o aumento do uso da Tibolona pode provocar algum impacto no meio ambiente;
 - Se existe alguma concentração ou método de exposição que poderia colocar a vida de animais em risco;
 - Avaliar se é possível determinar a concentração letal para *Poecilia reticulata*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o hormônio sintético feminino Tibolona exerce influência no ambiente aquático em que ela é inserida por meios de observações comportamentais dos animais realizando exposições em concentrações cada vez menores a fim de determinar a concentração letal para ambos os sexos.

Avaliar a interação da molécula da Tibolona na água de rio e verificar se existe decaimento da concentração da Tibolona por métodos analíticos.

1.2 OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

- Traçar perfil comportamental dos animais frente a contaminação da água pela Tibolona;
- Determinar CL_{50} para *Poecilia reticulata*.
- Avaliar degradação da molécula de Tibolona frente a condições de acidez e alcalinidade;
- Avaliar dissolução da Tibolona em água ultra pura e água de rio.
- Avaliar decaimento da concentração da Tibolona em água ultra pura e água de rio.

2 CAPÍTULO I

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ÁGUA EM ESCALA GLOBAL E BRASIL

O Planeta terra, apesar de receber este nome tem cerca de 1386 milhões de Km^3 de água (BRITO et al, 2014) Desta imensidão 2,53% representam água doce que se distribuem em 1,7175% nas calotas polares, 0,7725% nos depósitos subterrâneos profundos e 0,0075% em fontes de maior facilidade de acesso. (UNESCO, 2006). O ser humano extrai cerca de 8% do total anual de água doce renovável. O consumo per capita aumenta à medida que as condições de vida são melhoradas. Em contra partida, os recursos de água doce no mundo vem se reduzindo por conta de contaminação. Em média 2 milhões de toneladas de resíduos são despejados diariamente em águas receptoras incluindo resíduos industriais e químicos, dejetos humanos e produtos agrícolas como fertilizantes e pesticidas (UNESCO, 2006).

O Brasil é privilegiado com uma vasta rede hidrográfica e muitos dos seus rios se destacam pela extensão, largura e profundidade. Privilegiado pela natureza do relevo, predominam os rios de planalto, que acumulam alto potencial para geração de energia elétrica. Destacam-se entre os grandes rios do território brasileiro, o rio Amazonas e o Paraguai que são de planície e os rios São Francisco e Paraná que são de planalto (BRASIL, 1998). Calcula-se que o Brasil possui cerca de 14,94% do total de água doce renovável do mundo, concentra menos que 3% da população mundial e ainda assim tem demonstrado dificuldade de gestão deste recurso que reflete na escassez de água em que diversas regiões vem sofrendo (VIOLA, 2008).

O Brasil é constituído por três grandes bacias e de dois complexos de bacias hidrográficas. A do rio Amazonas, do rio Tocantins e o do São Francisco representam as três bacias, e o complexo de bacias é composto pelo Prata e do Atlântico. O Balanço hídrico mostra uma grande variação dentro do território brasileiro. Estes variam desde 48,2 L/s/km^2 no Atlântico Norte e 34,2 L/s/km^2 na bacia Amazônica até 2,8 L/s/km^2 na região do semiárido e 4,5 L/s/km^2 na bacia do rio São Francisco (BRASIL, 1998).

A produção de águas no Brasil, avaliada como escoamento anual afluente ao oceano atlântico é de 168.790 m^3/s . Somando a vazão da bacia Amazônica o Brasil tem disponibilidade total 257.790 m^3/s . Esta disponibilidade depende em grande parte do clima. O

ciclo e as vazões variam com o ciclo anual das chuvas e associadas os fenômenos de El Niño e La Niña. Estas alterações têm levado grande preocupação entre as comunidades científicas, políticas e de toda população (MARENGO, 2008).

A produção de chuvas nada mais é que a precipitação atmosférica e a transferência de água contida na atmosfera para a superfície da terra. Vários fatores podem influenciar nesta formação como a quantidade de vapor d'água presente na atmosfera, a característica geomorfológica local e o clima da região. Elas possuem função vital para a manutenção do meio ambiente. Podemos citar a manutenção da biodiversidade e do ecossistema, controlando a temperatura, a lixiviação evitando a salinização em algumas áreas, as inundações para continuidade ao ciclo de vida de algumas espécies como peixes e insetos, a recarga de aquífero, a recarga de corpos hídricos, atua como solvente universal arrastando mecanicamente impurezas tanto da atmosfera como do solo levando estes aos cursos d'água realizando a diluição e autodepuração (VIOLA, 2008).

Á água é considerada um item essencial para a vida e um insumo indispensável para a maioria, se não todas as atividades econômicas. É possível listar algumas das utilizações dos recursos hídricos social da água:

Alimentação e higiene

No Brasil estima-se que o desperdício de água pode chegar a 45% do volume ofertado a população (BRASIL, 1998).

Produção industrial

Em 1980 quantificou-se as demandas de uso consuntivos pela indústria e neste ano foi de 247 m³/s o que correspondeu cerca de 23% da demanda brasileira com estimativa total de 1065 m³/s. Para 1990 a indústria teve uma redução de 23% para 12%, em números, o consumo do Brasil foi de 1156 m³/s e para a industrial foi de 139 m³/s. Esta redução pode estar associada a elevação do custo da água, exigências ambientais, aumento do custo energético para captação da água e introdução de programas de melhorias operacionais e uso racional da água (BRASIL, 1998).

Geração de energia

A capacidade de geração de energia elétrica através de hidrelétricas tem contribuição percentual de 92% do total produzido no país (BRASIL, 1998).

Irrigação

Existem cerca de 145 milhões de hectares de área potencialmente indicadas para serem utilizadas na agricultura dos quais 45 milhões são potencialmente utilizáveis para agricultura irrigável (BRASIL, 1998).

Navegação

O privilegiado Brasil conta com 40.000 km de rede hidroviária dos quais mais da metade são precariamente navegáveis. Uma política de navegação foi desenvolvida para utilizar deste transporte, porém, nas zonas mais industrializadas e desenvolvidas não contam com rios e por esse motivo as políticas de transporte rodoviário apresentaram uma maior evolução (BRASIL, 1998).

Pesca e lazer

A pesca tem uma contribuição significativa para a economia informal e representa para grande maioria da população ribeirinha como a principal fonte de renda. O Brasil possui uma das maiores diversidades de peixes ornamentais e alimentam o mercado externo. O lazer vinculado aos recursos hídricos tem movimentado o turismo. Setores de turismo investem pesado para aumentar a renda e diversificar as atividades, explorando paisagens (BRASIL, 1998).

Outras atividades como a evacuação e diluição de esgotos, a drenagem e controle de enchentes, o combate a incêndios e a preservação de ambientes aquáticos (BRASIL, 1998).

A Figura 1 apresenta os fatores e indicadores ambientais que podem interferir na qualidade da água.

(Fonte: BRITO et al, 2014)

ambiente, os poluentes estão distribuídos na forma de gases, substâncias dissolvidas e partículas, que, interagindo com os agentes naturais intrínsecos, como os fatores climáticos e microbiológicos, característicos dos solos, das águas e dos próprios poluentes, atividades industriais, minerais e domésticas, modificam os indicadores de qualidade das águas, com conseqüentes efeitos ambientais negativos (Fig. 1.4).

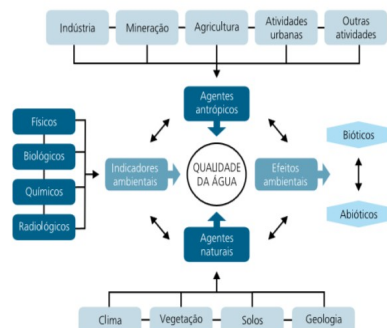
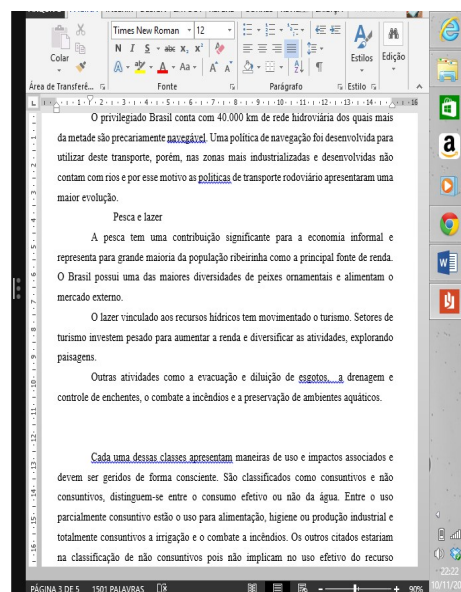


Fig. 1.4. Fatores e indicadores ambientais que interferem na qualidade das águas de uma bacia hidrográfica (Adaptado de Cheng, 1990).



Cada uma dessas classes apresenta maneiras de uso e impactos associados e devem ser geridos de forma consciente. São classificados como consuntivos e não

consuntivos, distinguem-se entre o consumo efetivo ou não da água. Entre o uso parcialmente consuntivo estão o uso para alimentação, higiene ou produção industrial e totalmente consuntivos a irrigação e o combate a incêndios. Os outros citados estariam na classificação de não consuntivos pois não implicam no uso efetivo do recurso (VARGAS, 1999).

As águas pluviais podem ser consideradas fontes alternativas de água para o consumo, desde que estas recebam tratamento adequado. Grandes quantidades de volume podem ser armazenadas e utilizados durante os períodos de estiagem (PROSAB, 2009). Segundo a (ANA, 2005), fontes alternativas de água são todas aquelas que não estão sob concessão dos órgãos públicos ou que não sofrem cobrança. No Brasil, estados como São Paulo, Rio de Janeiro já utilizam da retenção de águas de chuva e são usados com fins não potáveis como regas de jardins, lavagem de ambientes e descargas de vasos sanitários (PROSAB, 2009).

A Política Nacional do Meio Ambiente, regida pela Lei 6938 de 31/08/81 tem como objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental, ela considera o meio ambiente como patrimônio público. Outras organizações como SISNAMA, CONAMA, IBAMA, FBCN, ANAMMA e CNEA trabalham como objetivo comum na preservação e assecuridade do meio ambiente (BRASIL, 1998).

O Brasil conta com um programa nacional de monitoramento e avaliação ambiental, conhecido como MONITORE que tem como objetivo a implementação de um sistema de monitoramento para gerar e disponibilizar informações da situação ambiental no Brasil. Este programa está estruturado em cinco componentes, o ambiente costeiro e marinho, aquático continental, terrestre, atmosférico e urbano (BRASIL, 1998).

Com o avanço da ciência e tecnologia, surgiram as primeiras preocupações com a qualidade de água que estava sendo distribuída a população, e começaram a surgir as primeiras considerações sensoriais como gosto e aparência da água. Cresceram também a importância das características de qualidade físico-química e microbiológicas que se aperfeiçoaram ao longo dos anos. Com o avanço do estudo de doenças e crises de saúde, constatou-se que a contaminação das águas ou a escassez da mesma estavam na origem dos principais problemas de saúde da população urbana e rural (VARGAS, 1999).

A poluição pode ser definida como a alteração físico-química da água, alterações que tenham força para superar os limites ou os padrões estabelecidos. A água poluída também pode conter organismos patogênicos, substâncias tóxicas em teores que podem prejudicar a saúde humana (VARGAS, 1999).

Para acompanhar a crescente criação de poluentes pelas indústrias instituições de pesquisa em parceria com o governo investem pesadamente no desenvolvimento de técnicas para detectar e medir concentrações destes poluentes e ainda se possível determinar seus efeitos sobre a saúde humana e animal. Alinhado a isto, especialistas engenheiros tentam desenvolver técnicas para adaptar o tratamento da água bruta e enquadrá-las aos padrões de potabilidade que ficam cada vez mais rigorosos e em meados dos anos 60 concluíam que essa luta estava ficando insustentável em ambos os termos como ecológicos, político e econômicos. (VARGAS, 1999).

A concentração da população em algumas regiões agrava tanto na disponibilidade de água para o abastecimento quanto para a diluição de cargas poluidoras urbanas. No Brasil, atividades como desmatamento, uso inadequado de insumos agrícolas, a mineração e o aumento das cargas poluidoras agravam a situação de poluição hídrica. A distribuição anual das chuvas e as características climáticas levam a danos ambientais dos recursos hídricos. Os impactos mais recorrentes são a poluição de águas fluviais. Empresas como a siderurgia e garimpo tem se destacado na potência de poluição (BRASIL, 1998).

O homem se esbalda com a fartura da natureza e desestabiliza as condições de equilíbrio com o aumento da população, ignora a capacidade de tolerância da natureza e de suas exigências pontuais. Hoje a maior parte da água que é retirada da natureza não é consumida e quando retorna a sua fonte, retorna sem nenhum parâmetro de qualidade, desse modo em todas as partes povoadas da Terra a água doce está sendo degradada e o homem vem reforçando uma tendência em sentido contrário a manutenção da vida no planeta (MORAES, 2002).

2.2 CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS E A E INFLUÊNCIA NO SISTEMA ENDÓCRINO

A contaminação dos ambientes aquáticos é resultado principal do lançamento de esgotos domésticos e efluentes e industriais. Estudos apontam que os efluentes lançados nos corpos hídricos ainda estão carregados de poluentes, o que indica a ineficiência do tratamento da água tanto nas estações de tratamento de esgotos quanto nas estações de tratamento de efluentes que, por sua vez, deveriam ser especializadas na retirada de poluentes específicos. As formas e intensidades da contaminação dos corpos d'água dependem tanto das propriedades físico-químicas do meio receptor quanto das características da substância (FILHO et al, 2007).

As indústrias químicas e farmacêuticas destacam-se pelo lançamento de produtos que contribuem com o aumento dos micropoluentes emergentes no ambiente aquático.

Podemos citar como micropoluentes os medicamentos, os desinfetantes, os surfactantes, e alguns corantes. Centenas de toneladas de produtos farmacêuticos são parcialmente ou totalmente metabolizados pelos organismos que utilizam destes produtos e estes são excretados e descartados no meio ambiente. Diversas pesquisas acusam a presença destas substâncias no meio ambiente em níveis de traços em diversas partes do mundo e podem causar diferentes impactos no sistema em que estão diluídos (SOUZA, 2011).

A utilização da denominação micropoluentes emergentes, é atribuída a um grupo especial, de características particulares que em concentrações mínimas possuem grande poder de contaminação. Estas substâncias podem causar diversos efeitos e impactos no meio ambiente e representam um risco a saúde (SOUZA, 2011).

Moléculas naturais e sintéticas se somam no despejo diário de resíduos no meio ambiente. Dentre destas moléculas existe um grupo preocupante e são conhecidos como desreguladores endócrinos ou disruptores endócrinos, tema recente da campanha da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e metabologia e tema de reportagem no site de notícias G1. Este grupo reuni substâncias como os fitoestrogênios e metais pesados, pesticidas, herbicidas, solventes industriais e fungicidas. Mesmo em baixas concentrações, os desreguladores tem efeitos sinérgicos, acumulativos e de alto poder de penetração (SBEM, 2014).

A identificação de micropoluentes já é motivo de estudo desde a década de 90, o interesse no estudo dos interferentes endócrinos vem aumentando a cada dia por estas substâncias estarem interferindo fortemente no sistema endócrino de animais. Vários estudos concluem que mesmo em concentrações na faixa de ppb podem causar distúrbios endócrinos em animais e humanos. (GALINDO et al, 2012).

A Agência Nacional de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos define os desreguladores endócrinos como agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento (EDSP, 2011).

Estes compostos são detectados no meio ambiente em concentrações da ordem de grandeza de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Diversos efeitos maléficos são relatados pela literatura, efeitos como a diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminilização de peixes machos, alteração no sistema reprodutivo de peixes, répteis, pássaros e mamíferos entre outros. Estas influências negativas podem estar ligadas a diminuição da população de algumas espécies. Este tipo de contaminação não afeta diretamente ao ser humano e animais terrestres

mas conseguem alcançar estas mesmas espécies de forma indireta e, quando atingem em específico os seres humanos influenciam na quantidade de produção de esperma, aumento da incidência do câncer de mama, de testículo e de próstata (BILA, 2007).

Estas substâncias, além disso, podem danificar diretamente um órgão endócrino, alterar sua função, interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino. Hoje, as maiores preocupações relacionadas a esta exposição tanto de humanos quanto de animais é se essas substâncias podem realmente serem tóxicas em baixas concentrações, quais são estas substâncias, se a concentração destas substâncias são relevantes para serem consideradas uma ameaça se existe um limite em que a presença dessas moléculas podem ser consideradas seguras e se os métodos de avaliação e controle de hoje são capazes de fornecerem informações suficientes e consistentes para estudos e avaliação (BILA, 2007).

O comportamento dos disruptores endócrinos nas estações de tratamento tanto de efluentes como solo e sedimento estão sendo monitorados e investigados, avaliando como acontece o transporte até o meio ambiente. Essa avaliação tem importância crucial para entender como acontece a contaminação e prever os impactos na natureza (BILA, 2007).

As substâncias utilizadas na agricultura têm como principal objetivo afetar reações químicas e bioquímicas de insetos, microrganismos ou de qualquer outro ser vivo que tenha o interesse de eliminar ou mesmo controlar. A inserção destes agrotóxicos no meio ambiente pode ocorrer de várias maneiras podendo ser desde acidentais ou em aplicações e pelos escoamentos superficiais dos solos onde houveram aplicações. Alguns agrotóxicos são específicos para aplicação em água, porém o uso indiscriminado destes produtos podem acarretar diversos problemas. O Diclorodifeniltricloroetano (DDT) foi descoberto em 1949, conhecido como o primeiro estrógeno artificial (AMÉRICO, 2012).

Outras classes de substâncias são produzidas em escala industrial, são os ftalatos. São produzidos para aplicação em materiais de construção, moveis e roupas, outras substâncias como o dimetilftalato são utilizados em solventes, tintas, cosméticos e produtos farmacêuticos. Devido a sua ampla aplicação estes contaminantes aparecem tanto em pessoas quanto em animais domésticos e selvagens. São ingeridos, inalados ou podem contaminar através do contato. Alguns efeitos na reprodução masculina têm sido relacionados também com defeitos na espermatogênese (AMÉRICO, 2012).

Os estrogênios naturais são hormônios esteroides e são responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas. Agem no controle da ovulação, no desenvolvimento e no preparo cíclico do sistema reprodutivo. Estas substâncias também

atuam no crescimento de tecidos que proliferam o crescimento dos órgãos sexuais femininos, o comportamento, no sistema imunológico e asseguram a normalidade nos sistemas orgânicos. Os fitoestrogênios representam diversos hormônios naturais e que podem ser encontrados em plantas e nos homens. Grãos como ervilhas, feijão, vegetais e frutas contêm em sua composição o fitoestrogênios (AMÉRICO, 2012)

Estão presentes também os produtos farmacêuticos como o dietilestilbestrol (DES) e o 17-alfa-etinilestradiol que fazem parte do grupo de desreguladores endócrinos. Estes hormônios sintéticos são largamente utilizados como métodos contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa. O descarte indevido destes produtos podem acarretar em diversos e sérios problemas ao meio ambiente (AMÉRICO, 2012)

Pesquisas realizadas na região dos Grandes Lagos localizado entre os EUA e o Canadá, foi observado o acúmulo de PCB (policloreto de bifenilas), partindo de fitoplânctons até gaivotas. A concentração de PCB no aumentou: fitoplânctons = 250x; zooplânctons = 500x; truta = 2.800.000x e gaivota = 25.000.000 (GUIMARAES,2014).

Em resumo os disruptores podem ser substâncias orgânicas ou inorgânicas. Sua presença se dá em zonas urbanas e rurais, estão presentes em resíduos dos mais diversos ramos industriais e domésticos. Como descritos na tabela 1, os disruptores endócrinos são encontrados em depósitos de lixo contaminando o solo, lençóis freáticos, e o ar pela queima de resíduos em incineradores (GUIMARAES, 2014).

Tabela : Disruptores endócrinos, uso e ocorrência. (Fonte: adaptado GUIMARAES, 2014)

<i>Disruptores endócrinos</i>	<i>Ocorrências</i>	<i>Efeitos</i>
<i>Atrazina</i>	<i>Herbicidas</i>	<i>Redução na qualidade de esperma</i>
<i>Ascarel (PCB)</i>	<i>Óleo isolante dielétrico; papel copiativo não carbono, adesivos, lubrificante para laminas de corte, tintas, revestimento interno de silos para estocagem de grãos e leite nos anos 80</i>	<i>Declínio da função do sistema imunológico e aumento de doenças infecciosas, acumula-se no leite materno, endometriose, atravessa a barreira placentária e chega ao feto, crianças nascidas de mães com PCB no sangue tem peso e QI inferior; Acumula-se nos tecidos do feto</i>
<i>Benzo(a)antraceno</i>	<i>Alcatrão; Asfalto; Emissões de diesel, fundição de alumínio; graxas e óleos minerais</i>	<i>Alteram a ação de linfócitos, são mutagênicos</i>
<i>Bisfenol A</i>	<i>Resinas epóxi, revestimentos internos de latas para alimentos diversos</i>	<i>Substitui a recepção do estrogênio. Diminui a ovulação, aumento de secreção da prolactina</i>
<i>BTX (Benzeno,</i>	<i>Tintas, solventes, gasolina,</i>	<i>Anomalias menstruais, como aumento</i>

Disruptores endócrinos	Ocorrências	Efeitos
Tolueno e xilenos	<i>thinner, removedores</i>	<i>do sangramento e dos intervalos do ciclo. Na corrente sanguínea, fixam-se nos glóbulos vermelhos</i>
Manganês	<i>Produção de ferro e aço, eletrodos para solda, tintas e fertilizantes</i>	<i>Causa danos ao DNA dos linfócitos, Mal de Parkinson, impotência, concentra-se na tireoide, pituitária, suprarrenais e pâncreas</i>
Cádmio	<i>Ligas metálicas, solda, pigmentos, estabilizantes de plásticos, baterias, cinzas de incineradores, chapas galvanizadas</i>	<i>Câncer de próstata, concentra-se no pâncreas, testículos, tireoide e glândulas salivares, acumula-se no leite materno, atrofia testicular, redução no volume do esperma e tumores em testículos.</i>
Chumbo	<i>Baterias, soldagem, primmers, aviação, pigmentos, ligas, tintas, gasolina de aviação</i>	<i>Redução na qualidade e quantidade de esperma. Hipotireoidismo decorrente de alterações funcionais da hipófise, acumula-se no leite materno, atrofia testicular, reduz a quantidade de esperma, abortamento espontâneo, acumula-se na tireoide, adrenais, pituitária, testículos e ovários, passa pela placenta entre 12 e 14ª semana, atinge o cérebro do feto, aumento significativo na taxa de abortamentos, natalmortalidade, prematuridade, diminuição no crescimento pós-natal e aumento na taxa de malformações.</i>
DDT	<i>Inseticidas</i>	<i>Acumulam-se no leite materno, aumento de irregularidades menstruais</i>
Metirimol, Eritimol e Ciprodinil	<i>Fungicidas aplicados em frutas e cereais</i>	<i>Inibem a produção de hormônios esteroides</i>
Dibenzeno-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados	<i>Incineração de resíduos urbanos e de resíduos perigosos; produção e queima de pesticidas, como pentaclorofenol, agente laranja, benzenos clorados, aciarias; queima de carvão; fundição de alumínio; produção de pvc. Emissão de diesel</i>	<i>Acumulam-se no leite materno, alterações nas glândulas sebáceas, suprime as funções imunológicas, redução do número de espermatozoides, neoplasia de tireoide, disfunção neurofisiológica bilateral nos lobos frontais do cérebro, acumula-se na tireoide.</i>
DBPC (Dibromocloropropano)	<i>Nematicida</i>	<i>Diminuição da motilidade e da produção de espermatozoides</i>

<i>Disruptores endócrinos</i>	<i>Ocorrências</i>	<i>Efeitos</i>
<i>Dissulfeto de Carbono</i>	<i>Fabricação de celofane, solvente para ceras, óleos, lacas e resinas, vulcanização a frio de borrachas, componentes de certos tipos de inseticidas, parasiticidas e herbicidas</i>	<i>Disruptor no balanço hormonal entre o cérebro, glândula pituitária e ovários, levando a distúrbios menstruais</i>
<i>Estireno</i>	<i>Fabricação de plásticos e borrachas diversas</i>	<i>Abortamento espontâneo</i>
<i>Ftalatos</i>	<i>Plastificantes de cloreto de polivinila e do acetato de celulose, vernizes, inseticidas e cosméticos</i>	<i>Redução na qualidade do esperma, causam demasculinização e feminilização</i>
<i>Triclorfon</i>	<i>Medicamento anti-helmíntico</i>	<i>Diminuição de espermatozoide e de fluido seminal, espermatozoides com formato anormal.</i>

Entre todos os sistemas de equilíbrio que constituem o ser humano, o sistema endócrino é considerado o mais importante. Cada componente deste sistema, pode-se dizer, cada órgão que compõem o sistema endócrino tem uma função característica, que é sintetizar um tipo de hormônio com uma função específica, que tem como principal efeito a regulação em outros órgãos (GUIMARAES, 2014).

A ação dos disruptores endócrinos é basicamente a substituição dos hormônios do corpo, ou bloqueio das ações naturais ou até mesmo aumentando ou diminuindo a quantidade original dos hormônios naturais o que pode alterar as funções endócrinas do ser vivo contaminado. Por vários anos os homens e animais passaram por grandes transformações advindas das ações dos hormônios naturais encontrados em alimentos e diante desta presença contínua os seres vivos se adaptaram para sobrevivência. A grande diferença dentre os desreguladores endócrinos naturais para os produtos químicos que temos hoje e a sua eliminação. Os produtos químicos se acumulam em tecidos gordurosos e não são metabolizados e eliminados e passam a agir continuamente e como se fossem os hormônios segregados pelas glândulas alterando o funcionamento do corpo (GUIMARAES, 2014).

A ação específica de um hormônio inicia-se através da sua ligação a um receptor no interior de uma célula. Regiões do DNA são conectadas ao complexo resultante. O Hipotálamo secreta hormônios que controlam a liberação de outros hormônios que induzem a fabricação e a atividade de hormônios específicos. Ocorre o transporte pela corrente sanguínea até os tecidos-alvo e ocorre uma mudança na atividade celular nos receptores. Estas

atividades são controladas por mecanismos de feedback onde são ativados e desativados de acordo com os níveis hormonais (CHISELLI & JARDIM, 2007).

A alteração do sistema endócrino ocorre quando a interação entre os receptores hormonais e o interferente endócrino modifica a resposta natural que seria gerada. Quando esse fenômeno acontece podem surgir dois processos bem distintos. A ligação pode produzir uma resposta atuando como mimetizador, quando a resposta imita a ação de um determinado hormônio. Essa inibição recebe o nome de agonista. Se a ligação não produzir nenhuma resposta, a substância estará agindo como um bloqueador, logo ele estará impedindo a interação entre o receptor e o hormônio natural. Este fenômeno recebe o nome de antagonista. Outros efeitos podem ser observados, dependendo da natureza do disruptor. Efeitos como alterações na síntese e na remoção dos hormônios de seus receptores e também na interação com sistemas multi-hormonais (CHISELLI & JARDIM, 2007).

Essas complexas reações e formações de complexos não estão presentes apenas nos seres humanos, elas existem de forma contínua e são partes vitais do metabolismo de qualquer ser vivo incluindo os vegetais. Este é o motivo pelo qual uma substância interferente, neste complexo e sensível sistema pode atuar, alternando o desenvolvimento, reprodução e outras importantes funções dos seres vivos que tenham ou sofram este tipo de exposição (AMARAL, 2012).

Diante da atual situação global e todos os estudos até hoje realizados é real a nossa ineficiência atual quando falamos de tratamento de esgotos domésticos e de efluentes industriais para retirada e purificação de corpos d'água contaminados com estes desreguladores. Dessa forma intensos esforços estão sendo gastos na investigação e desenvolvimento de novas técnicas para não só eliminar como também diminuir a atividade biológica daquelas moléculas que não forem retirados do meio. Recentes estudos como a ozonização e os processos oxidativos avançados mostraram-se como alternativas promissoras na destruição destas substâncias para o tratamento de água potável e de outros sistemas aquosos. Outros estudos com carvão ativado, nano filtração e osmose reversa também estão sendo pesquisados (BILA, 2007).

A ozonização se mostrou como uma das tecnologias mais promissoras na remoção de desreguladores naturais e sintéticos. Estudos indicam uma rápida oxidação destas substâncias com baixas doses de ozônio e que podem ser utilizadas em estações de tratamento de água potável atingindo eficiência de até 97% (BILA, 2007).

Com a evolução dos contaminantes e dos meios de tratamento das águas, a química analítica também evoluiu na missão de detectar e quantificar esse tipo de

contaminante. Devido à complexidade da matriz, geralmente águas de rios ou de esgoto aliado a baixíssimas concentrações destes analitos, chegando a ser traços da molécula, dificulta a avaliação em alguns equipamentos e obriga a busca por meios de extração e concentração de amostras afim de detectar com precisão e exatidão esses contaminantes (CASTRO, 2010).

Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofotometria de massas estão sendo utilizadas na análise destes componentes. Após alguns anos de evolução a combinação de técnicas analíticas como LC/MS ou LC/MS-MS, ou LC-LC/MS-MS estão conseguindo detectar quantidades infinitesimais de hormônios sintéticos e naturais, porém ainda assim é preciso a utilização de vários passos para purificação da amostra e algumas vezes a sua reconstituição. Outras técnicas biológicas estão sendo desenvolvidas como é o caso do ensaio de ELISA que tem alta sensibilidade. Amostras são preparadas com extração para aumentar ainda mais seu limite de detecção (CASTRO, 2010).

2.3 A TIBOLONA E SUAS CARACTERÍSTICAS

A certeza afirmada pelos meios de comunicação de que os hormônios são a chave para a vida e o bem estar de homens e mulheres é cada vez mais inserida no cotidiano das pessoas. Trabalhos e publicações científicas abordam o tema com cuidado e meios de comunicação extrapolam na publicação de reportagens demonstrando que o corpo gira em torno dos hormônios, e os elevam a posição de sinônimos de vida. A filosofia de que os hormônios determinam tudo desde nossa gestação está cada vez mais forte, ligações com a inteligência e do nosso comportamento frente ao sexo oposto estão ganhando cada vez mais adeptos. Hoje assistimos uma era de corpos trabalhados e construídos através de hormônios, sejam eles por precursores ou puros, naturais ou sintéticos (ROHDEN, 2008).

De fato, as mulheres são o alvo principal de campanhas com este tipo de substância. O alvo feminino está diretamente ligado a hipótese de que o corpo da mulher é governado pelas transformações hormonais e suas alterações cíclicas e instáveis. Fenômenos como a tensão pré-menstrual, uso de anticoncepcionais e menopausa são argumentos utilizados para alimentar uma grande indústria que prometem o tratamento e a devolução da qualidade de vida. Não bastando disso, os hormônios hoje são usados para explicar as diferenças intelectuais entre homens e mulheres, se existem. (ROHDEN, 2008).

A grande responsável e por ter atribuições técnicas para a produção destes medicamentos é a indústria farmacêutica. A maioria das industriais farmacêuticas foram criadas no fim do século 19 e no início do século 20. Ela é responsável não só pela produção mas também pela atividade de desenvolvimento, pesquisa, comercialização e distribuição de

medicamentos. Por segurança, a indústria farmacêutica só comercializa seus produtos após vários meses de estudos e testes e dependendo do grau de dificuldade para este desenvolvimento, validação, produção, e distribuição o medicamento pode vir a ter um alto custo, reflexo de todo investimento para seu lançamento (BRITO, 2009).

A indústria farmacêutica no Brasil é considerada de desenvolvimento tardio perante a outros países, e este crescimento se deu pela necessidade de melhora da saúde pública e as práticas sanitárias de prevenção e combate as doenças (BRITO, 2009).

Empresas multinacionais como Roche, Pfizer e Merck atuam há muitos anos no mercado e carregam uma grande carga de conhecimento e experiência, enquanto isso, empresas nacionais estão caminhando para sua evolução, e independente disso entregam produtos de confiança e qualidade. O Brasil entra na rota das empresas biotecnológicas mais inovadoras do mercado de medicamentos, o que reflete a posição de líder no mercado de genéricos em menos de 10 anos de desenvolvimento (BRITO, 2009).

A tibolona é um medicamento utilizado para o controle dos sintomas da menopausa causada por origem natural ou cirúrgica o que resulta na deficiência de estrógenos e atua com um repositor hormonal (RYMER, 2002). Tem relação estrutural aos derivados da 19-noretisterona como o noretinodrel e noretisterona (ARAÚJO,2009)

Figura : Estrutura molecular da Tibolona. (Fonte: Araújo, 2009)

2.1. TIBOLONA

A tibolona, algumas vezes codificada na literatura por Org OD14 ou 7 α MNa ou ainda na forma oficial (7 α ,17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-nor-17-pregn-5(10)-en-20-in-3-ona, é um esteroide sintético relacionado estruturalmente com os derivados da 19 - noretisterona, tais quais noretinodrel e noretisterona (Figura 2.1) (BOERRIGTER et al., 2002). Esse fármaco é utilizado no tratamento dos distúrbios da menopausa natural ou cirúrgica resultantes da deficiência estrogênica, tais como: sudorese excessiva, osteoporose, distúrbios do humor, atrofia e secura vaginal. Após administração oral é rapidamente metabolizada predominantemente em três tipos de esteróides ativos, 3- α -hidroxi-metabolito, 3- β -hidroxi-metabolito e isômero Δ^4 , dos quais os dois primeiros têm atividade essencialmente estrogênica, enquanto o terceiro possui predominantemente atividade progestogênica. Os metabólitos são excretados na bile e

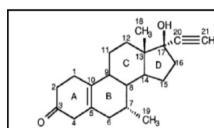


Figura 2.1. Fórmula estrutural da tibolona (BOERRIGTER et al., 2002a).

Recebe oficialmente o nome de ((7 α ,17 α)-17-hydroxy-7methyl-19norpregn-5 (10)-em-20yn-3-one), é um esteroide sintético com estrutura parecida com o norestinodrel. Este hormônio artificial possui fracos efeitos estrogênicos e baixas propriedades androgênicas. Quando comparado a outros medicamentos como o etinilestradiol a Tibolona apresenta uma potência estrogênica 50 vezes menor e 8 vezes menor quando comparado ao noretisterona (ALBERTAZZE et al, 1998).

Org OD14 ou 7-alfaMNa ou 7-alfa-metil-17-alfa-etinilestradiol, estes são os nomes que intitulam a popularmente conhecida Tibolona. Esta é um esteroide sintético largamente utilizado e aprovado em mais de 45 países para prevenir a perda óssea e aprovada em 90 países para tratamento de sintoma do climatério, período que é caracterizado por uma diminuição progressiva na função ovariana (MARIMON, 2014). Tem relação estrutural com os derivados da 10-norestiesterona como a noretinodrel e noretiterona. Tem eficiência comprovada no tratamento dos sintomas decorrentes da menopausa natural ou cirúrgica e na prevenção de osteoporose na pós-menopausa. Seu mecanismo de ação ocorre nos receptores estrogênicos, nos progestogênicos e androgênicos. O decréscimo da produção de hormônios no climatério vem quase sempre acompanhado de sintomas como ondas de calor, alterações de humor, nervosismo, grande irritabilidade, depressão, atrofia, ressecamento vaginal e a diminuição do libido. Contra todos esses efeitos a tibolona é uma opção valiosa de tratamento para as mulheres que sofrem dessas condições, e além disso, podem ter efeitos positivos sobre bem-estar sexual e humor. Além de todas essas vantagens ela apresenta boa tolerabilidade e está associada a uma baixa incidência de sangramento vaginal e câncer de mama (WEHBA et al, 2000).

Os esteroides em definição, são um grupo de compostos solúveis em gordura, possuem uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si. Todos os esteroides se assemelham entre si apresentando núcleo cíclico de seis carbonos ao qual se liga a um anel ciclopentano. Quando um composto possui um ou mais grupos hidroxila e nenhum grupo carbonil ou carboxil ele recebe o nome de esterol (HARBER et al, 2002).

Devido a assimetria da molécula de esteroide, é possível encontrar diversas estruturas na conformação tridimensional tanto em cadeira quanto em barco. Nos esteroides naturais, quase todos os anéis estão no formato de cadeira pelo motivo de ser a forma mais estável de conformação (HARBER et al, 2002).

O colesterol está presente nas estruturas das membranas celulares e é uma substância fundamental na formação dos esteroides e é considerado um reagente de partida para biossíntese de diversos hormônios (HARBER et al, 2002).

Os esteroides estão distribuídos nos organismos vivos e incluem os ativos farmacêuticos utilizados na maioria das pílulas anticoncepcionais (HARBER et al, 2002).

A formação do hormônio exige que o colesterol seja clivado na mitocôndria formando o delta-5-pregnenolona. A pregnenolona é então convertida para progesterona através da ação enzimática da 3-beta desidrogenase e da delta-4,5-isomerase. As conversões

de outros hormônios específicos são necessárias também outras enzimas específicas. Após essa síntese os hormônios se difundem pela membrana plasmática e chegam a corrente sanguínea onde se ligarão as proteínas transportadoras (KLOOSTERBOER, 2004).

O desenvolvimento da síntese da Tibolona foi patenteada pela empresa NV Organon em 1965 e melhorada em 1967 e 1969 (ROSA & TOLOTTI, 2012). Em 1991 foi identificado a capacidade da Tibolona de se apresentar em duas formas cristalinas diferentes, a forma monoclinica e a forma triclinica. Diversos estudo sobre o polimorfismo da molécula descobriu-se que a cristalização da Tibolona solubilizada em acetona e posterior adição de água gera um cristal monoclinico enquanto os cristais triclinicos são obtidos com o resfriamento de uma solução de tolueno quente (ARAUJO, 2009).

Algumas das propriedades físico-químicas de um solido variam muito quando a estrutura cristalina deste é alterada. Propriedades como as elétricas, dureza, ponto de fusão e vapor, solubilidade, densidade, propriedades óticas, higroscopicidade, reatividade, estabilidade física e química são algumas das características que podem se diferenciar de uma estrutura cristalina de outra de um mesmo composto. Essas alterações influenciam drasticamente na sua manipulação e utilização pela indústria e desenvolvimento de novas tecnologias. Na área farmacêutica por exemplo, propriedades como velocidade de dissolução, biodisponibilidade, densidade, compactação e propriedades reológicas do pó, além da estabilidade física e química dos medicamentos. O mais importante fator a ser considerado na influência do polimorfismo na área farmacêutica e a biodisponibilidade, Ocorre quando existe uma dependência entre a velocidade de dissolução e a velocidade de absorção *in vivo*, ou seja, a concentração plasmática máxima e o tempo para obtê-la. E relação a Tibolona é descrito sem comprovação experimental que a forma II apresenta uma menor velocidade de dissolução que a forma I (ARAUJO, 2009).

Com peso molecular médio de 312,45 g a tibolona se apresenta como um pó de cor branca tem ponto de fusão em 196°C um índice de refração de 105° e deve ser mantido a uma temperatura entre 2 a 8°C. Informações sobre sua toxicidade e estabilidade ainda permanecem sem referências na literatura (CHEMICAL BOOK, 2008).

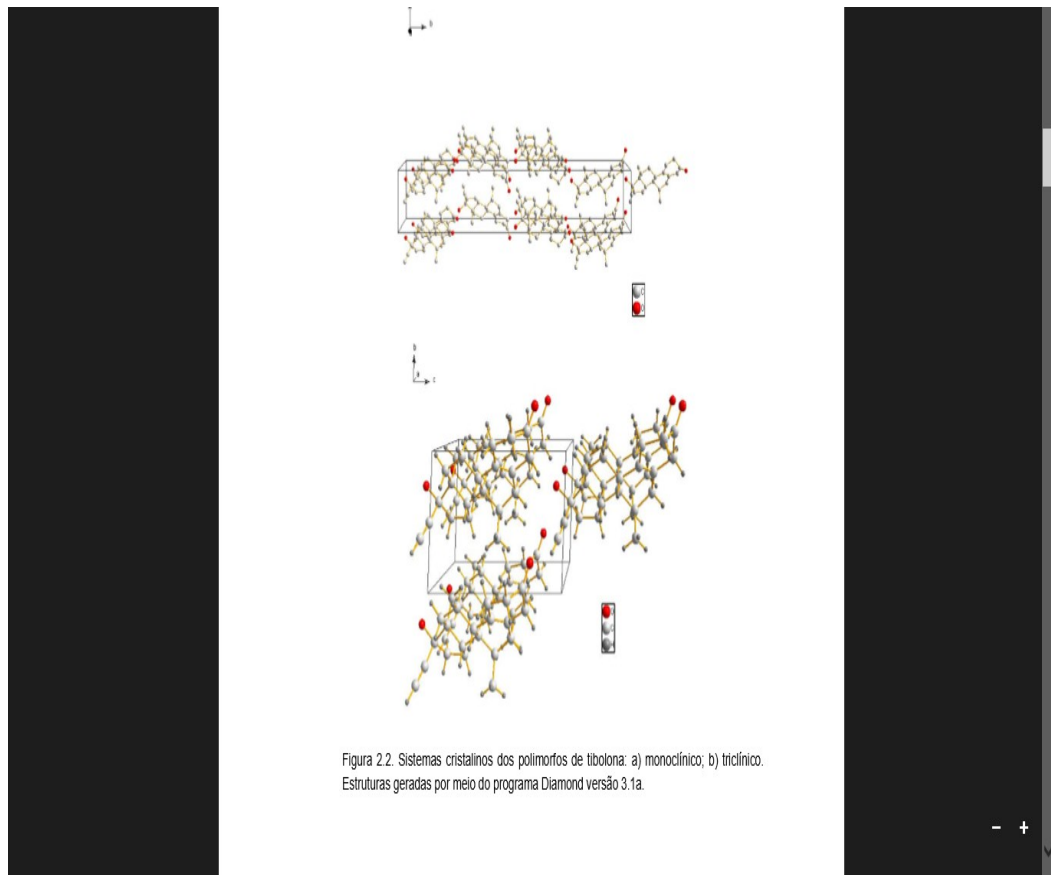
Apesar de ser uma molécula conhecida a mais de 40 anos, a tibolona foi recentemente incluída em um compêndio farmacêutico oficial, a farmacopeia europeia. Nesta monografia é encontrado a metodologia de infravermelho para a identificação das amostras. Se neste método não for possível a sobreposição das bandas do infravermelho e identificação da amostra, a monografia indica recrystalizar a tibolona evaporando o etanol utilizado como solvente. Este procedimento, segundo estudos, indica que o padrão utilizado pela farmacopeia

européia é monoclinica e a recristalização desta amostra levaria a mesma do estado polimorfo triclinico para o estado monoclinico (ARAUJO, 2009).

Basicamente existem sete tipos de sistemas cristalinos: triclinico, monoclinico, ortorrômbico, tetragonal, trigonal, hexagonal e cubico (ARAUJO, 2012)

A tibolona apresenta uma propriedade de cristalização em dois sistemas cristalinos diferentes, o monoclinico e o triclinico. Essa propriedade de cristalização em diferentes estruturas, ou arranjos, dá-se o nome de polimorfismo. Em definição, polimorfismo é a habilidade de uma substancia existir no estado solido, com duas ou mais estruturas cristalinas diferentes, e por consequência, cada polimorfo é uma fase cristalina distinta. As substancias podem se apresentar estruturadas e espacialmente bem organizados. Esta regularização de estrutura é chamada de cristal e são muito comuns em sustâncias e compostos sólidos. O processo de cristalização é caracterizado pelo arranjo de aproximadamente 10^{20} moléculas ou íons em um grupo. Grande parte dos esforços para entendimento do comportamento polimórfico deste composto, relacionados a termodinâmica e a eventos cinéticos, foram gastos por pesquisadores de centros holandeses. Como resultado, conclui-se que a fase triclinica pode ser obtida pelo crescimento de cristais em solventes apolares como por exemplo n-hexano e tolueno, enquanto a fase monoclinica pode ser obtida em meios polares como acetonitrila e acetona, representados na Figura 3 (ARAUJO, 2012).

Figura : Sistemas cristalinos (ARAUJO, 2009).



Empresas como NeoQuímica (Tibial), EMS (Livial), GERMED (Tibolona), manufacturam a tibolona, ambos com dosagens de 2,5 mg por comprimido com uso oral. Segundo a bula do medicamento referência, Livial, cada comprimido contém como excipientes o amido de batata, estearato de magnésio, palmitato de ascorbila e lactose. A Tibolona é contra indicada em grávidas e fase de lactação, neoplasia estrógeno, antecedência e ou suspeita de câncer de mama, tromboembolismo, sangramento genital, hiperplasia, doenças hepáticas alergias a qualquer componente da formula e porfiria. Como posologia indica-se o uso de um comprimido ao dia sempre no mesmo horário recomendando a menor dosagem eficaz pelo menor período de tempo quando usado para início e manutenção de tratamento dos sintomas da menopausa. Em mulheres com menopausa natural a Tibolona é recomendada para no mínimo 12 meses após a última menstruação (LIVIAL, 2013).

A bula ainda traz a informação de que a Tibolona tem toxicidade aguda em animais muito baixa e não espera-se sintomas de toxicidade quando muitos comprimidos são ingeridos ao mesmo tempo (LIVIAL, 2013).

2.4 A MULHER E O CICLO DE MATURIDADE

A menopausa é definida como o último ciclo menstrual com a parada permanente do cíclico reprodutivo definitivo em consequência da perda da atividade folicular ovariana e redução na produção ovariana, ocorre dentro de 48 a 52 anos de idade e só é reconhecida depois de 12 meses com ausência de fluxo menstrual (SILVA & BORGES, 2012).

Ela é considerada um ciclo vital e importante na vida de uma mulher. Mesmo sendo uma etapa de envelhecimento natural ela ainda provoca medo e desconforto por diversos fatores. Este envelhecimento fisiológico pode afetar diretamente a qualidade de vida biológica, psicológica e social da mulher. Isto se deve ao fato de várias mudanças urogenitais e podem atingir também a sexualidade, principal motivo de preocupação e preconceito (ADERNE & ARAUJO, 2007).

Com o aumento da expectativa de vida nos países, estima-se que a mulher passa cerca de um terço da vida dentro do período da menopausa. Pelo fato da sexualidade ser hoje reconhecida como um dos grandes fatores que refletem na qualidade de vida da mulher, é importante o reconhecimento das necessidades individuais de cada mulher durante as transformações do climatério e promovendo o bem estar ao longo do seu envelhecimento (SILVA & BORGES, 2012).

Algumas vezes as alterações são vivenciadas sem queixas, ou seja, a mulher passa pela transição sem sofrer nenhum efeito do climatério, outras vezes esta mesma fase pode ser muito expressiva e vir acompanhada de transformações que podem alterar a rotina das mulheres de forma significativa. A individualidade neste parâmetro de observação é muito importante, é possível que ocorram sintomas neuropsíquicos como distúrbios vasomotores, dores de cabeça, ansiedade, depressão, fadiga, insônia, perda do apetite sexual entre outros fatores particulares (Brasil B, 2008).

Muitos profissionais da saúde afirmam e reforçam que o uso de medicamentos hormonais generalizadamente, e ignora ou simplesmente não considera outras formas de tratamento disponíveis para aliviar os sintomas queixados. Hábitos mais saudáveis, uma alimentação balanceada e atividades físicas, o uso de fitoterápicos são importantes aliados para enfrentar esta etapa da vida feminina. A displicência médica neste quesito se faz tão radical que alguns autores intitulam o uso de hormônio como uma forma de salvar as mulheres da tragédia da menopausa, outros utilizam o termo “elixir da juventude”, popularizando a menopausa como uma doença (Brasil B, 2008).

O envelhecimento é um ciclo caracterizado por muitas mudanças e independente das diferenças do envelhecimento individual, esta fase é muito influenciada pela ideologia cultural individual. A crença entre a incapacidade motora e sexual faz parte de todos os âmbitos sociais e na maioria das vezes estes valores são pontos de vigia pela sociedade atual. A auto estima e os valores cultuados a sociedade jovem tendem a depreciar a sociedade idosa, afetando principalmente as mulheres (VANSCONSELLOS, 2004).

O envelhecimento sexual é apontado como a fonte mais crescente da angustia tanto para mulheres quanto para homens. Talvez pela cultura ocidental de desvalorização humana de idosos que tem tornado mais potente este descaso que nas culturas orientais, que muitas vezes cultuam os mais velhos como sinônimo de sabedoria e experiência. Na mulher, os preconceitos ficam ainda maiores. Mitos como a assexualidade feminina, a falência reprodutora, a atração erótica da beleza e jovialidade e a sexualidade feminina ligada aos hormônios ovarianos impactam diretamente na autoestima e no psicológico de mulheres maduras (BRASIL B, 2008).

2.5 TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL E TRANSFORMAÇÕES DA TIBOLONA

A terapia de reposição hormonal (TRH), significa repor ao organismo o que ele não produz mais, neste caso os estrogênios. Mesmo com ampla divulgação tanto de autores quanto da indústria farmacêutica, a quantidade de mulheres que fazem uso do TRH não chega a 30%. A reposição hormonal pode ser realizada de duas formas diferentes:

a) a ingestão de hormônios sintéticos

Esta está relacionada com o uso de medicamentos que são compostos de estradiol e estrona, que seriam sintetizados no ovário. A maioria destes medicamentos estão disponíveis na forma de comprimidos e cápsulas com administração oral, na forma de adesivos com liberação transdérmica, percutâneos ou também na forma de creme vaginal. Cada forma farmacêutica é indicada para um tipo de sintomas e em casos específicos como alergia a formulas ou antecedentes de problemas hepáticos e hipertensão (MENEHIN & BORTOLAN, 2014)

Vários são os efeitos colaterais relatados quando mulheres utilizam da terapia de reposição hormonal. O uso de estrogênios podem desencadear efeitos como dores nas mamas, cólicas abdominais, alterações de humor, fadiga, depressão, irritabilidade, alterações na pele, aumento de peso, ansiedade são dependentes da dosagem e do tipo de medicamento utilizado. Quando se faz uso de estrogênios efeitos como náuseas, distúrbios gastrointestinais,

Este esteroide sintético demonstra diversos efeitos contra os maiores problemas que as mulheres se queixam como as ondas de calor, dores de cabeça, insônia, dores nas costas, palpitações, falta de ar, perda do libido (ALBERTAZZI, 1998), além disso apresenta um efeito de redução da atrofia vaginal, melhoras de problemas urogenitais como ressecamento, contribui para melhoria, bem estar e prazer sexual, previne a perda óssea e não influencia no aumento da densidade mamária (KENEMANS & SPEROFF, 2004).

Existe um consenso de que a Tibolona é uma valiosa opção para o tratamento de mulheres com sintomas de climatéricos, além de melhorar estes efeitos já mencionados ela tem efeitos positivos para o bem-estar sexual e humor. Apresenta boa tolerabilidade e está associado a uma baixa de sangramentos vaginais e dores na mama. Em relação ao câncer de mama dados estatísticos demonstram que o número de mulheres sob situação de risco com tratamento de reposição hormonal com a tibolona é baixo e se existe este risco ele é menor quando comparado ao tratamento estrógeno-progestrógenos (BRASIL B, 2008).

Após a ingestão a Tibolona é metabolizada predominantemente em três outros esteroides, Gama-4isomero, 3-alfa-hidroxitibolona e 3- beta-hidroxitibolona. Esta conversão para estes metabolitos pode ocorrer nos tecidos alvo com atividades específicas para cada tecido (RYMER, 2002).

A Tibolona é muito rapidamente metabolizada em 3-alfa e 3-beta-hidroxi tibolona por 3-alfa e 3-beta hidroxitibolona desidrogenase no fígado e intestino. Ambos os metabolitos têm uma meia-vida de cerca de 7h, mas os níveis circulatórios da 3-alfa demonstram atividades biológicas com o tempo de até 4 vezes maior do que os outros metabolitos e mantém a sua atividade progestogenica no endométrio durante muito mais tempo. O terceiro metabolito, o Delta 3-isomerase é formado diretamente da 3-beta-hidroxitibolona-isomerase. A maioria dos metabolitos de tibolona (aproximadamente 80%) são os mono e di-sulfatada formas inativas, a partir do qual os metabolitos estrógenos podem ser formadas continuamente através da enzima sulfatase. Foi recentemente suposto que a atividade estrógeno de tibolona pode ser devido à sua conversão em 7-metil-Etinil-estradiol, um estrogênio muito potente, pela aromatase no fígado (KLOOSTERBOER, 2004).

2.6 POECILIA RETICULATA

A *Poecilia reticulata*, também conhecido popularmente como guppy ou barrigudinho está presente em diversas áreas do planeta e se concentram na América do Sul e

américa central. Esta espécie de peixe tem a capacidade de sobreviver em ambientes com alto nível de contaminantes e por tanto, conseguem sobreviver em ambientes que a maioria dos peixes não conseguiriam. Muitas espécies desta família principalmente *Poecilia reticulata*, são utilizados como indicadores biológicos (GOMIDE, 2008)

O guppy é uma das espécies de peixes que foram introduzidas em ambientes acidental ou artificialmente. A introdução artificial destes pequenos peixes em alguns países se deram do descarte de aquarofilistas e particularmente para o controle de crescimento de mosquitos transmissores de doenças. O guppy se alimenta das larvas de alguns insetos e por esse motivo ele acabou sendo introduzido em lagos e pequenos riachos nos países tropicais. A invasão de habitats por espécies de cativeiro pode ser considerada a terceira maior ameaça a biodiversidade, perdendo apenas para a destruição e fragmentação dos habitats iniciais (GOMIDE, 2008).

A espécie exótica *Poecilia reticulata*, pertence à família Poeciliidae, e em ambientes naturais tem a capacidade de indicar alterações ambientais negativos. Por possuírem adaptações ecológicas ela proporciona um grande sucesso na colonização em variados ambientes. Adaptações como alta competência na competição inter e intraespecífica, ou seja, utilizam dos mesmos recursos das espécies nativas e possuem capacidade de suportar variações extremas no ambiente. Estas habilidades podem ocasionar a eliminação de espécies nativas (SOUZA & TOZZO, 2013)

Castro (1999) descreve que a morfologia externa de peixes de pequeno porte tem alto número de caracteres, porém em menor escala e com menor desenvolvimento no sistema látero-sensorial, menor número de escamas e com olhos mais avantajados. Estas adaptações ajudam a enfrentar variações de pressão, temperatura, espaço, luz e recursos naturais (SOUZA & TOZZO, 2013)

As fêmeas da *Poecilia reticulata* possuem coloração castanho claro uniforme nos flancos e no dorso. Os machos possuem manchas esféricas negras e áreas pelo corpo com coloração brilhante e podem variar em amarelo, laranja, vermelho e azul. As cores, tamanho, posição e flexibilidade das manchas variam conforme a pressão de predação no habitats. Em locais com maior predação os machos são mais opacos e menos coloridos. A *Pecilia reticulata* apresenta dimorfismo sexual e é representado por fêmeas maiores e machos com a nadadeira anal modificada em gonopódio (VALÉRIO et al, 2014).

Os peixes desta família são de pequeno porte apresentando tamanhos entre 13,9mm a 200mm, apresentam boca ligeiramente voltada pra cima e estas características concedem a eles uma diversidade de espécies com aproximadamente 27 gêneros e 299

espécies e se espalham pelo continente africano e americano, em água doce e salgada (LUCINDA, 2003).

2.7 ANÁLISE INSTRUMENTAL

A cromatografia teve início de seu desenvolvimento em 1950. Nesta época eram utilizadas partículas irregulares de 100 a 200 µm com baixíssimas eficiências de separação. Em meados dos anos 60 colunas de separação com partículas rígidas de 40 a 50 µm ofereciam eficiência em torno 1000 pratos em uma coluna de 15 cm. Dez anos depois as partículas de recheio diminuíram para 10 µm levando a um salto na eficiência de separação para 6000. Com o passar dos anos partículas esféricas cada vez menores promoveram um aumento para 30000 pratos teóricos em um caminho de 15 cm (MALDANER & JARDIM, 2009).

A mais de 30 anos a sílica vem sendo utilizado como o principal e preferido material para preparação de fases estacionárias, para este caso, o recheio de colunas de separação. A sílica apresenta características como grande estabilidade á altas pressões, tem uma grande facilidade de modificação e principalmente as suas propriedades e estruturas são muito conhecidas (MALDANER & JARDIM, 2009).

A cromatografia é utilizada para identificação de diversos compostos pela comparação de um padrão pré existente. As purificações das amostras são muito estudadas na tentativa de diminuir interferentes, que são aquelas substancias indesejáveis e ou também para a separação de componentes de uma mistura. Ela pode ser classificada por diversos critérios como pela forma física do sistema cromatográfico como em coluna ou planar; pela fase móvel empregada no arraste, conhecida como líquida quando a fase móvel é um líquido, gasosa quando o arraste é feito por um gás e a supercrítica usando um vapor pressurizado. Pode ser classificada também pela fase estacionária quando sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. Ainda pode ser classificada pelo seu modo de separação (DEGANI et al, 1998).

No passado técnicas como a espectrofotometria e métodos biológicos eram muito utilizados para determinação da qualidade das águas. Com a chegada e introdução de técnicas cromatográficas as análises se tornaram mais específicas e seletivas, gerando resultados mais precisos exatos e reprodutíveis (DEGANI et al, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIBOLONA

3.1.1 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS DE IDENTIFICAÇÃO

A Tibolona utilizada para teste foi cedida por uma indústria farmacêutica localizada no estado de Goiás. Esta era mantida em embalagem original, de cor âmbar para impedir a passagem de luz, conservada em ambiente refrigerado e seco.

Foi verificado de forma visual as características sensoriais da Tibolona como cor e aparência.

Para verificação da sua pureza, a Tibolona foi padronizada com padrão primário também cedido pela indústria farmacêutica. O padrão primário de Tibolona foi preparado conforme método validado (ROSA & TOLOTTI, 2012) o qual a matéria-prima também foi submetida.

A comparação das áreas do padrão e matéria-prima, foram avaliadas em cromatografia líquida com adaptações para otimização de método em coluna cromatográfica disponível e equipamento utilizado.

Foi avaliado também por outro laboratório farmacêutico a identificação da Tibolona do padrão e matéria-prima utilizando espectro infravermelho seguindo metodologia presente na farmacopeia britânica.

Para avaliação da solubilidade em água foram realizados testes de recristalização, para alterar a estrutura molecular da Tibolona com intuito de torna-la mais solúvel em água. Os solventes utilizados foram: metanol, Acetonitrila, benzeno e dimetilsulfóxido

3.1.2 PREPARAÇÃO DA TIBOLONA E SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA TESTES EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA

3.1.2.1 PREPARO DO PADRÃO DA SOLUÇÃO DE TIBOLONA

Pesou-se quantitativamente 35,0 mg de Tibolona e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionou-se 50% do volume com metanol. O balão volumétrico foi levado ao ultrassom até completa solubilização. Completou-se o volume com etanol. Transferiu-se 100 µL da solução mãe para balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com etanol. Filtrou-se 1,0 mL em membrana de 0,45 µm diretamente no vial utilizado para injeção.

3.1.2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO TESTE EM ÁGUA ULTRAPURA E ÁGUA DE RIO

Para este experimento utilizou-se de dois béqueres com volumes de 2 litros e uma chapa com agitação magnética. Este aparato foi montado com a intenção de simular a turbulência existente nos rios e submeter a molécula a estes movimentos. A Figura 4 representa um esquema de como foi montado o aparato para realização do experimento.

Figura : Aparato montado para simulação de turbulência dos rios.

Água

Estas soluções ficaram sob máxima agitação a fim de produzir vórtex dentro do béquer. A exposição foi monitorada durante 5 dias alternando o ambiente da sala com 12 horas de claridade e 12 horas de sombra.

O béquer 1 foi avolumado em 1 litro com água milli-q, retirada do equipamento de ultrafiltração do laboratório de Farmacocinética da Universidade Federal de Goiás. O béquer número dois foi avolumado com água do rio Meia Ponte coletado em na cidade de Inhumas, Goiás.

Partindo da solução mãe recém preparada com concentração de 10 µg/mL, transferiu-se lentamente 1,0 mL para béquer contendo 1 litro de água destilada. Manteve-se no béquer agitação em velocidade máxima gerando vortex para garantir a homogeneização da Tibolona em todo o béquer. Após um período de 30 minutos de agitação coletou-se 2,0 mL da solução e filtrou-se em membrana 0,45 µm diretamente no vial para injeção. Este procedimento foi realizado durante 5 dias, uma vez ao dia. Foram realizadas triplicatas para cada injeção.

Da mesma forma foi realizado e preparado para o béquer contendo água do rio Meia Ponte.

3.1.2.3 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA DEGRADAÇÃO

Pesou-se quantitativamente 70,0 mg de Tibolona e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionou-se 50% do volume com metanol e levou-se o balão volumétrico para ultrassom até completa solubilização. Completou-se o volume com metanol. Transferiu-se 100 µL da solução mãe para balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com metanol.

3.1.2.4 DEGRADAÇÃO ÁCIDA

Utilizando micropipeta foi transferido 500 µL da solução padrão de degradação para vial e adicionou-se 500 µL de solução de HCl 2M. Foram preparados 5 vials. Estes foram envolvidos com plástico filme a fim de evitar evaporação do solvente. Foram expostos as condições de temperatura ambiente e 12 horas de luminosidade e 12 horas de sombra por dia durante 5 dias. Foi realizado a injeção de cada vial em triplicata sendo um vial por dia de monitoramento. Concentração final de 0,0035 mg/mL.

Este mesmo procedimento de preparo e exposição da amostra foi realizado utilizando uma solução de degradação de hidróxido de sódio 2M.

3.1.2.5 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para preparo da curva de calibração foram escolhidos 5 pontos.

Partindo da mesma solução em concentração preparada para degradação, que possui a concentração dobrada em relação a concentração de trabalho, transferiu-se os volumes e realizou-se as diluições conforme tabela 2.

Tabela : Curva de calibração.

	<i>Ponto 1</i>	<i>Ponto 2</i>	<i>Ponto 3</i>	<i>Ponto 4</i>	<i>Ponto 5</i>
Concentração da solução padrão	7 µg/mL	7 µg/mL	7 µg/mL	7 µg/mL	7 µg/mL
Volume pipetado	2,0 mL	4,0 mL	6,0 mL	8,0 mL	-
Volume de diluente	8,0 mL	6,0 mL	4,0 mL	2,0 mL	-
Concentração final	1,4 µg/mL	2,8 µg/mL	4,2 µg/mL	5,6 µg/mL	7,0 µg/mL

Após as diluições as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm e acondicionadas no equipamento pra injeção. Foram injetadas triplicas de cada amostra e realizado a média dos valores.

3.1.3 POECILIA RETICULATA

Os animais foram coletados no Parque Ipiranga, localizado no município de Anápolis no estado de Goiás. Os peixes retirados da natureza foram aclimatados em tanques com ambiente controlado por 40 dias para avaliar a saudabilidade e adaptação ao novo ambiente.

Para o experimento foram selecionados peixes macho e fêmeas sadios e aclimatados por mais 3 dias nos aquários de exposição.

Foram separados 10 animais de cada sexo para cada grupo, ou seja, cada grupo de exposição foi formado de dois aquários cada um contendo um grupo de 10 peixes machos ou 10 peixes fêmeas.

Os grupos de estudos foram divididos entre:

- Grupo controle negativo: Grupo livre de qualquer contaminante;
- Grupo controle: Grupo contaminado com volume de 2,0 mL de etanol;
- Grupo 1: Grupo contaminado com Tibolona dissolvida em etanol na concentração final de 3,4 $\mu\text{g/mL}$
- Grupo 2: Grupo contaminado com Tibolona dissolvida em etanol na concentração final de 4,6 $\mu\text{g/mL}$.
- Grupo 3: Grupo contaminado com Tibolona dissolvida em etanol na concentração final de 5,7 $\mu\text{g/mL}$.

Com auxílio de uma pequena rede com aste, os peixes foram transferidos do aquário de aclimatação para os aquários de exposição.

A exposição dos animais foi realizada por um período de 96 horas.

3.1.4 PREPARO DOS AQUÁRIOS

Os aquários foram previamente lavados com água sanitária, foram realizados 3 enxagues com água potável para retirada do cloro e de possíveis contaminantes. Foi adicionado 3,5 litros de água em cada aquário e saídas de oxigênio foram instaladas individualmente em cada aquário para oxigenação da água. A figura 6 representa o sistema que foi montado para a realização do experimento.

Figura : Esquema de disposição montado para aquários, peixes e bomba de oxigênio.

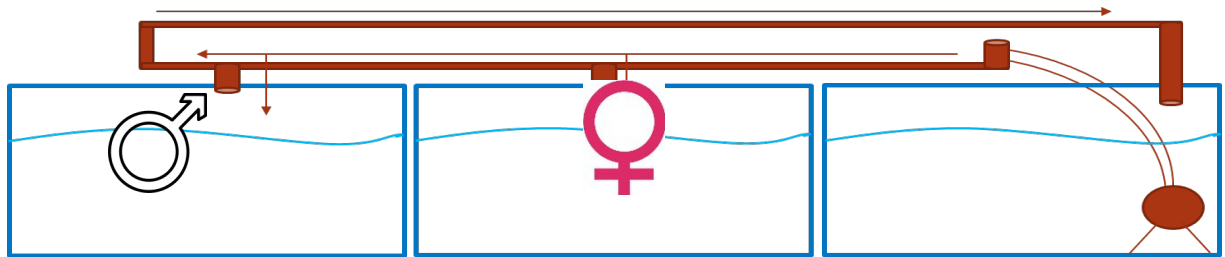


Imagem : Sistemas de aquários utilizados na experimentação.



Foram coletados parâmetros físico-químicos da água para avaliação de sua identidade de qualidade antes da inicialização do experimento, para garantir que parâmetros como pH, amônio estivessem dentro dos padrões preestabelecidos. O sistema mostrado na Imagem 1 foi mantido sem alteração por todo o experimento com oxigenação ligada 24 horas por dia durante os cinco dias de exposição.

3.1.5 CROMATOGRAFO LIQUIDO

Foi utilizado 2 cromatógrafos para os ensaios. Cromatógrafo líquido Perkin Elmer localizado no Laboratório Nacional da Agricultura e o Cromatógrafo Thermo localizado na faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

Os Cromatógrafos são equipados com detector de fotodiodo injetores automáticos e bomba quaternária.

As condições cromatográficas foram:

- Coluna: Phenomenex 4,6 x 150 cm, 5 µm.
- Comprimento de onda: 204 nm
- Varredura DAD: 200 a 400 nm
- Fluxo: 1,5 ml/min
- Tempo de corrida: 6 min;
- Fase Móvel: Água e Acetonitrila (30:70)
- Temperatura: 25°C
- Volume de Injeção: 20 µL

3.1.6 Fator de condição Alométrico

Após o experimento os animais foram eutanasiados por decapitação e registrou-se o peso total (Wt) as medidas de comprimento total (Lt) e comprimento padrão (Lp). Para determinação do fator de condição alométrica utilizou-se a expressão:

$$K = Wt/Lt^b$$

Onde:

Wt = Peso Total

Lt = Comprimento Total

B = coeficiente angular da relação peso-comprimento obtido pela linha de regressão na forma logarítmica dos dados.

K = Fator de condição alométrico.

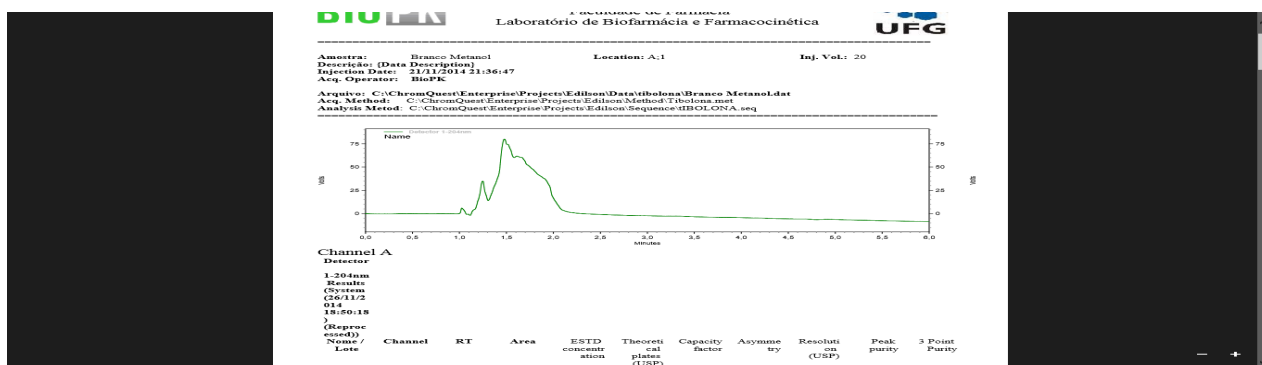
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CROMATOGRAFIA PARA DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DE MÉTODO

Para avaliação da potência da Tibolona foi utilizado o método (ROSA & TOLOTTI, 2012) e constatou-se uma pureza de 100%, ou seja, a potência da matéria-prima está igual a pureza do padrão primário utilizado como padrão de referência.

A Figura 7 representa a injeção do metanol, ou seja, o diluente utilizado como branco o que indica a inexistência de qualquer interferente provindo do solvente.

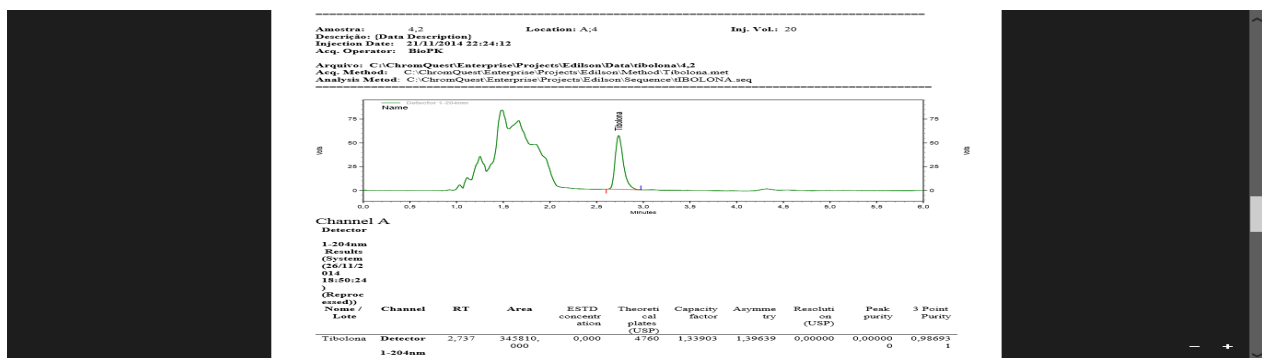
Figura : Cromatograma construído com a injeção do branco (metanol).



A avaliação do branco da amostra, utilizando do solvente utilizado na solubilização da amostra é recomendada por todos os métodos de avaliação cromatográfica e item verificado na validação de metodologia normalizado pela ANVISA. Este cromatograma representa a evolução da detecção do equipamento pelo tempo da corrida total de 6 min. Os primeiros picos estão relacionados ao volume morto da coluna, e não devem ser considerados a fim de cálculos ou parâmetros de referência.

A Figura 8 representa o cromatograma da injeção da solução de Tibolona padrão primário na concentração de 4,2 µg/mL. O tempo de retenção de aproximadamente 2,7 minutos.

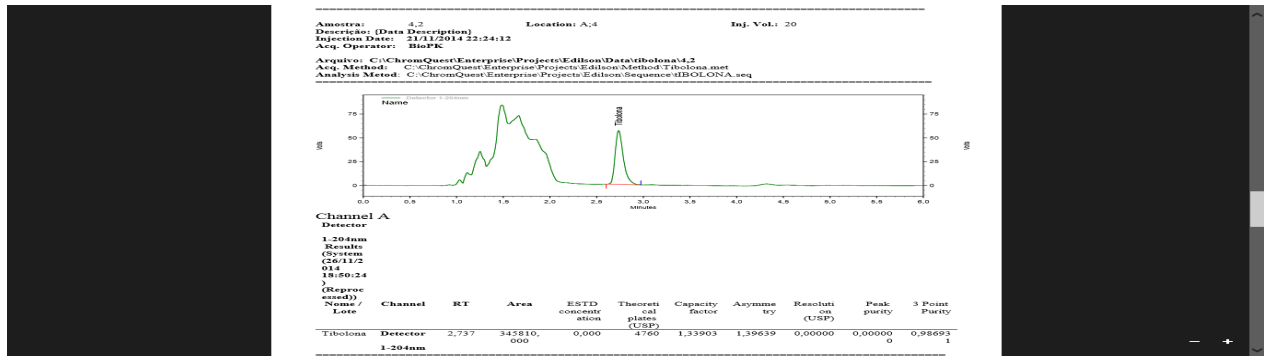
Figura : Cromatograma obtido da injeção do padrão da tibolona em sobreposição.



Utilizando da ferramenta disponível no software EzChrom Elite, utilizado pelos equipamentos da Agilent Technologies é possível realizar a sobreposição dos cromatogramas e avaliar a diferença entre uma corrida e outra. A sobreposição acima é possível concluir que o volume morto e o pico da Tibolona estão bem definidos e com ótima resolução.

A Figura 9 representa a injeção da amostra do composto teste utilizado para avaliar o tempo de retenção entre amostra e padrão.

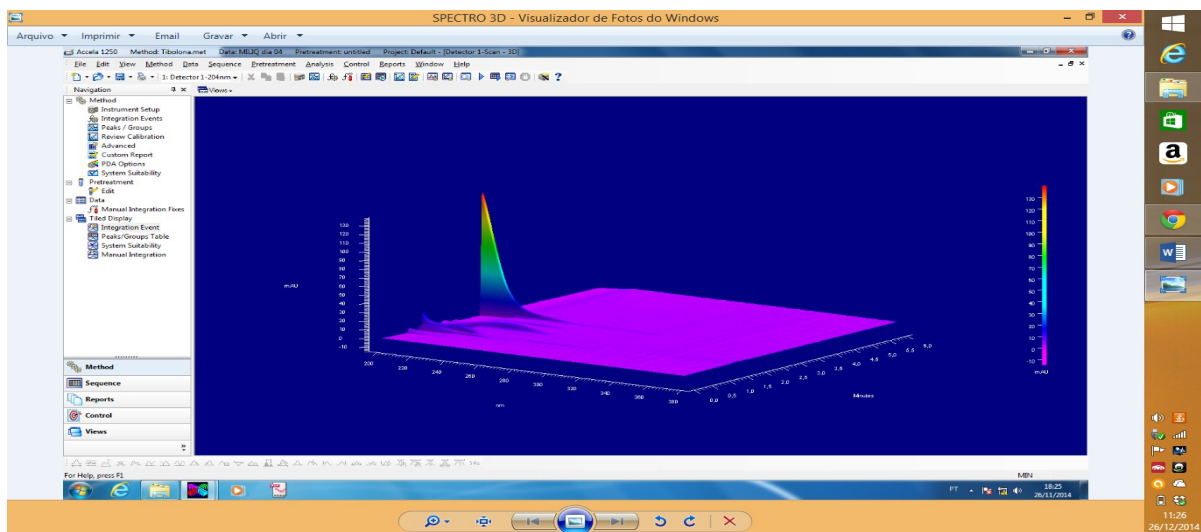
Figura : Cromatograma obtido da injeção da matéria-prima da tibolona em sobreposição



Novamente utilizando da ferramenta de sobreposição de cromatogramas, possívem verificar que o metanol, utilizado como solvente, não é detectado pelo equipamento e não representa nenhum pico cromatográfico que possa interferir na quantificação da Tibolona. È possível concluir também que visualmente a substancia teste apresenta sobreposição exata ao cromatograma do padrão. Esta sobreposição exata significa que praticamente não existe diferença entre Padrão utilizado e substancia teste, e podemos concluir que esta matéria prima possui 100% e potencia igual a 1.

A Figura 10 representa a varredura em 3 dimensões, realizada pelo detector de fotodiodos, esta imagem nos fornece informações sobre a pureza do pico cromatográfico, ou seja, nos mostra se existe algum interferente presente no mesmo tempo de retenção do ativo principal. Neste caso obtivemos uma pureza de pico de 0,977 superior ao recomendado pelo equiplamento que deve ser $>0,95$.

Figura : Imagem tridimensional do pico de tibolona.



Esta varredura realiza cálculos com sobreposição de comprimentos de ondas e avalia a homogeneidades dos mesmo dentro um faixa especifica de comprimentos de ondas. Considera-se como um pico homogêneo, ou seja, puro, aquele que tem resultado deste cálculos acima de 0,95. As deformações presentes no início do gráfico são deformações provenientes da volume morto, ou seja, são deformações provenientes da detecção de compostos presentes no diluente enquanto percorrem todo o comprimento da coluna.

O método utilizado satisfaz todas as condições necessárias para quantificação do composto teste como também confirmado e validado por ROSA & TOLOTTI, 2012.

4.2 RECRISTALIZAÇÃO.

Assim como citado ARAUJO, 2009 foram utilizados solventes orgânicos e não orgânicos como água, metanol, acetonitrila e Dimetil sulfóxido para recristalização da Tibolona com a intenção de modificar sua estrutura cristalina e alterar sua solubilidade. As tentativas foram realizadas diversas vezes alterando as soluções em combinações entre solubilização, cristalização, resuspensão e recristalização.

Todas as tentativas não surtiram efeito significativo na solubilidade da molécula. Esta observação foi concluída pela precipitação e insolubilidade dos cristais em água, e livre solubilidade em misturas orgânicas com pequenas porções de água. As imagens 2, 3 e 4 ilustram as formas cristalinas para os solventes anteriormente mencionados.

Imagem : Recristalização por evaporação da Tibolona em Metanol.

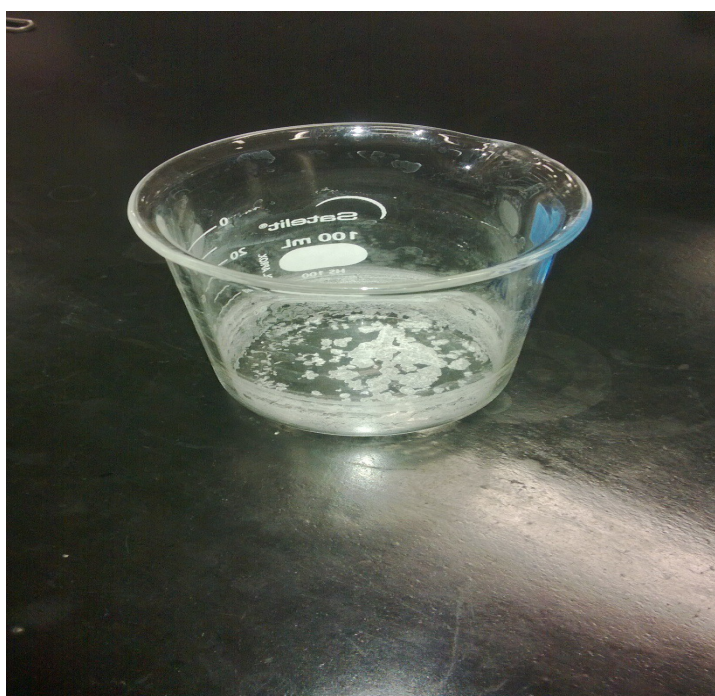
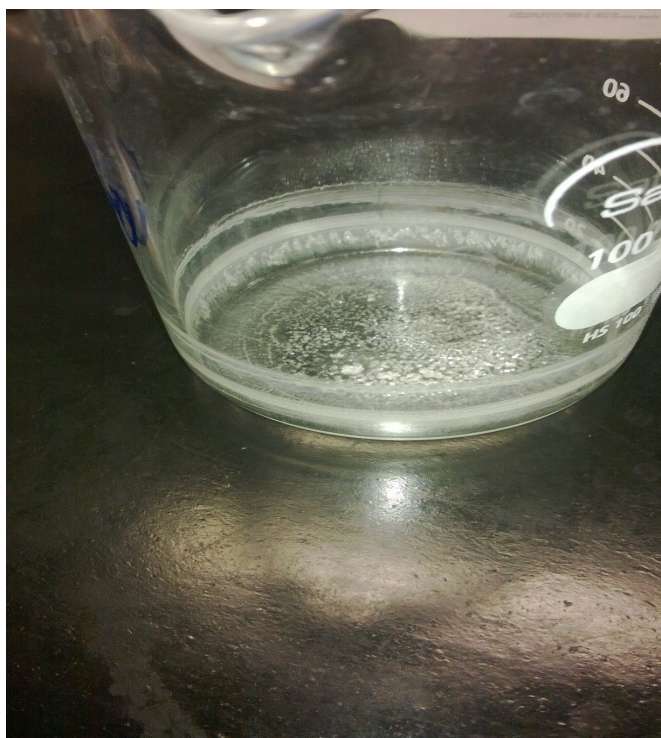


Imagem : Recristalização da tibolona em acetonitrila.



Imagem : Recristalização da Tibolona em Dimetilsulfóxido



Após as tentativas de rescrystalização da molécula e resuspensão em água, não foi observado nenhum aumento da capacidade de solubilização da Tibolona em meio aquoso, e continuando livremente solúvel em solvente orgânicos. A resposunção e alteração da forma

polifórmica para a Tibolona não tem influencia na sua capacidade de solubilização em meio aquoso.

4.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA

4.3.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para avaliação do decaimento da área da Tibolona, foi construída uma curva com cinco pontos com níveis de concentração entre 1,4 µg/mL até 7,0 µg/mL.

A curva de calibração foi realizada em triplicata para cada ponto e uma regressão linear foi construída para avaliar sua capacidade de linearidade. Na Tabela 3 é possível avaliar a precisão e exatidão dos resultados de valores de áreas gerados pelo Cromatógrafo líquido.

Tabela : Áreas obtidas dos cromatogramas obtidos da curva de calibração

	<i>Concentração (µg/mL)</i>	<i>Área</i>	<i>Média</i>
Ponto 1	1,4	142782	137067
		127069	
		141350	
Ponto 2	2,8	235896	238283
		238490	
		240463	
Ponto 3	4,2	344635	345810
		346321	
		346474	
Ponto 4	5,6	499578	500895
		501346	
		501761	
Ponto 5	7,0	641409	640598
		640998	
		639387	

Figura : Curva de calibração

Utilizando o método validado por ROSA & TOLOTTI, 2012, outra faixa de linearidade foi utilizada para adequação ao experimento. Utilizando de ferramentas matemáticas como a regressão linear, foi possível concluir também que a faixa utilizada é adequada para cumprimento da linearidade do método utilizado para quantificação da Tibolona nos experimentos.

Avaliando a regressão linear, demonstrado na figura 11 é possível aceitar o o coeficiente de correlação linear r^2 com valores acima de 0,95 para um método linear indicados

pela legislação da ANVISA RE 899 que regulamenta parâmetros de validação de metodologia analítica. A faixa testada resultou em um coeficiente de correlação de 0,99, o que significa que as variáveis de regressão utilizadas possuem alta capacidade de reverter os valores conhecidos nos resultados esperados.

4.3.2 DEGRADAÇÃO FORÇADA EM MEIO ÁCIDO

A degradação da molécula foi feita com solução ácida de HCl a 2M. Foi injetado imediatamente após o preparo da solução e diariamente em triplicata até o fim dos 5 dias de avaliação.

Nas primeiras horas, a molécula de Tibolona se manteve estável porém no segundo dia de análise não foi possível encontrar o pico da Tibolona. Esta alteração é um indicativo de degradação da molécula em condição ácida, porém o método utilizado não é suficiente para indicar se a degradação foi completa ou parcial nem detectar possíveis picos de degradação.

As imagens 12 e 13 apresentam a injeção no primeiro dia de degradação e a segunda imagem traz a alteração do cromatograma e a não identificação do pico de Tibolona no tempo de retenção estabelecido.

Para os dias 3, 4 e 5, as injeções foram realizadas porém o desaparecimento do pico cromatográfico indicou a degradação total da Tibolona.

Figura : Cromatograma obtido com a degradação forçada da Tibolona em meio ácido. Dia 01.

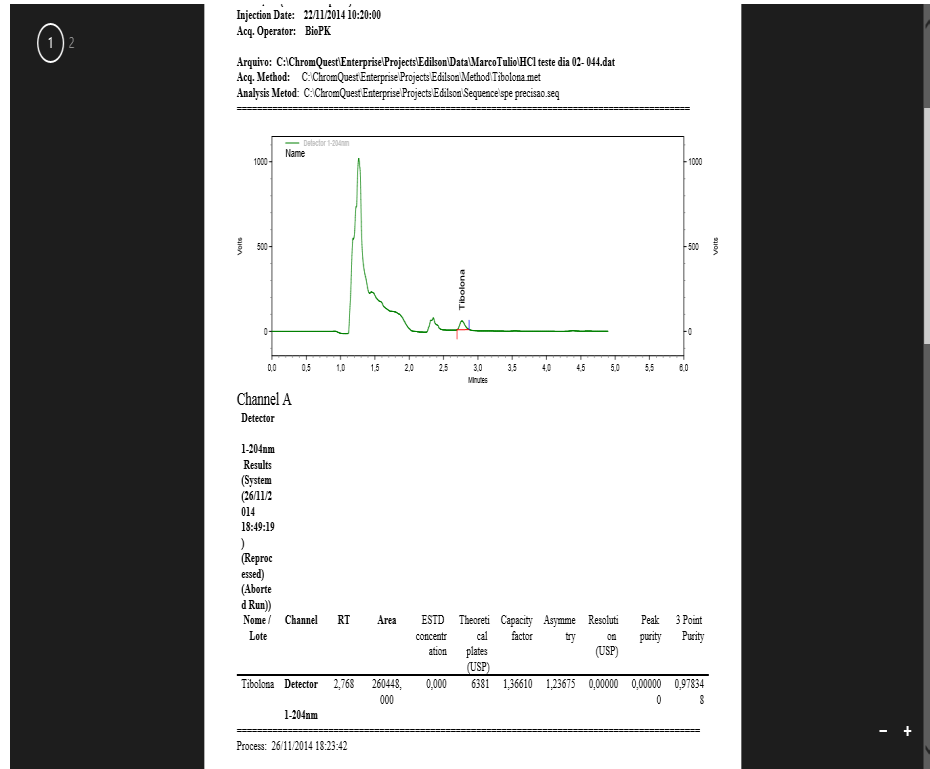
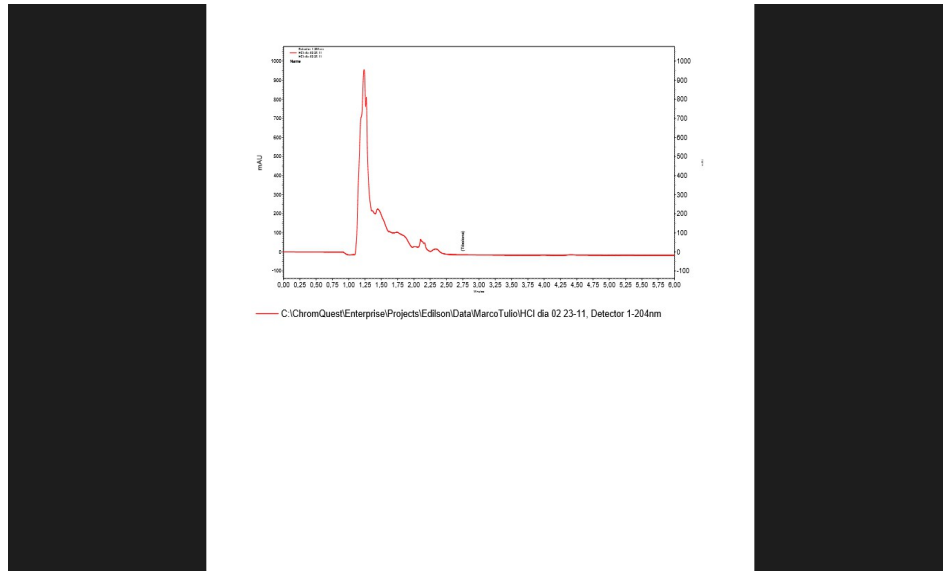


Figura : Cromatograma obtido da degradação forçada da Tibolona em meio ácido. Dia 02.

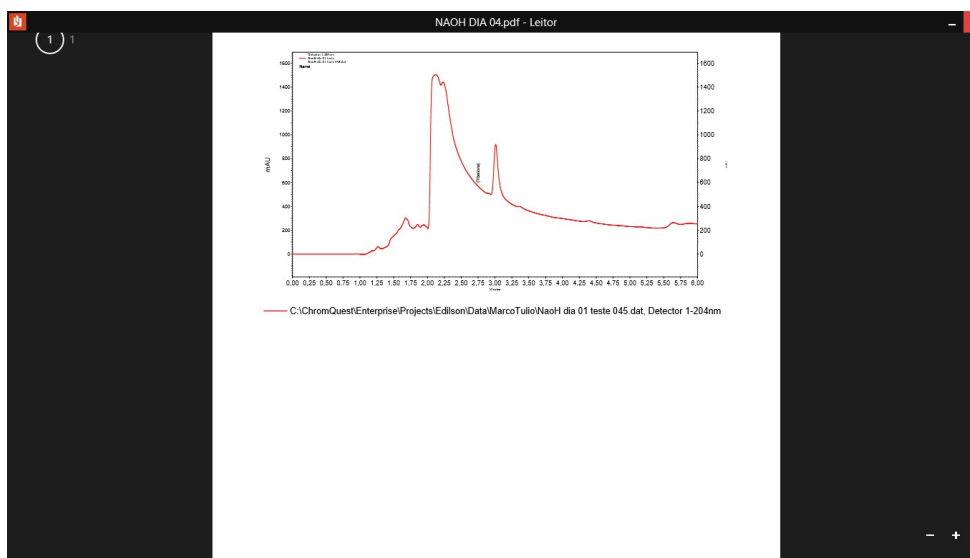


4.3.3 DEGRADAÇÃO FORÇADA EM MEIO BÁSICO

Nas primeiras horas, houve uma alteração brusca do cromatograma, indicando uma possível degradação total da molécula ou alteração no tempo de retenção. A formação de um pico posterior comprova estas duas possibilidades. Esta alteração é um indicativo de

degradação da molécula em condição básica, porém o método utilizado não é suficiente para indicar se a degradação foi completa ou parcial nem detectar possíveis picos de degradação. O pico se manteve até o fim dos cinco dias de análise. A Figura 14 representa esta alteração do cromatograma.

Figura : Cromatograma obtido da degradação forçada da Tibolona em meio básico.



4.3.4 DEGRADAÇÃO EM ÁGUA ULTRA PURA

As injeções da solução simulada em laboratório demonstraram uma diminuição da concentração da Tibolona em contato com água ultra pura, a alta hidrofobicidade da molécula de Tibolona fez com que parte da sua concentração da solução preparada em metanol se precipitasse diminuindo a concentração real dentro do béquer.

Avaliando os resultados das áreas obtidas pelos cromatogramas podemos verificar uma diminuição de até 43% a partir da concentração inicial.

As tabelas 4 e 5 mostram diminuição da quantidade de Tibolona livre na solução em análise nos dois experimentos.

Tabela : Decaimento da concentração da Tibolona em água ultra pura no experimento 1.

<i>Experimento 1</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração</i>	<i>% Decaimento</i>
Dia 1	563183	6,30	-37,0
Dia 2	506475	5,68	-43,2
Dia 3	579174	6,47	-35,3
Dia 4	563968	6,30	-43,2
Dia 5	534727	5,90	-41,0

Tabela :Decaimento da concentração da tibolona em água ultra pura no experimento 2.

<i>Experimento 2</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração</i>	<i>% Decaimento</i>
Dia 1	593758	6,67	-33,3
Dia 2	558410	6,15	-38,5
Dia 3	569234	6,36	-36,4
Dia 4	530975	5,94	-40,6
Dia 5	518943	5,81	-41,9

Esta diferença entre a concentração esperada e a concentração real pode ser explicada pela baixa solubilidade da Tibolona em meio aquoso. Esta baixa solubilidade já era esperada como nos testes de recristalização. Com a transferência da Tibolona diluída em metanol para o béquer contendo água, pode ter ocorrido a precipitação da molécula diminuindo a sua disponibilidade e concentração.

4.3.5 ANÁLISES DE DEGRADAÇÃO EM ÁGUA DE RIO

Para avaliar a disponibilidade da molécula em água de rio, realizamos o mesmo procedimento de contaminação e coleta descrito para a avaliação da Tibolona em água ultra pura.

A queda da disponibilidade da molécula desde o início de seu contato com a água do rio meia ponte foi bem maior quando comparada a avaliação em água ultra purificada. Não foi observado presença de precipitado na água, portanto é possível dizer que a molécula pode ter se degradado ou ter sido metabolizada por microrganismos ou outro fator químico ou biológico presente na água do rio meia ponte, e o teor de Tibolona teve uma diminuição de até 88% do valor esperado.

Foi detectado concentrações até o terceiro dia de experimento, nos dias quatro e cinco o método não foi capaz de detectar a presença da molécula na água do rio.

As tabelas 6 e 7 demonstram este decaimento.

Tabela : Decaimento da concentração da tibolona em água de rio no experimento 1.

<i>Experimento 1</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração</i>	<i>% Decaimento</i>
Dia 1	178835	2,06	-79,4
Dia 2	92127	1,10	-89,0
Dia 3	121975	1,43	-85,7
Dia 4	0	0,00	-
Dia 5	0	0,00	-

Tabela : Decaimento da concentração da tibolona em água de rio no experimento 2.

<i>Experimento 2</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração</i>	<i>% Decaimento</i>
Dia 1	192444	2,21	-77,9
Dia 2	173459	2,00	-80,0
Dia 3	99875	1,19	-88,1

Dia 4	0	0,00	-
Dia 5	0	0,00	-

Este decaimento superior ao esperado e superior ao que aconteceu na água ultra pura pode ser explicada tomando a premissa da presença de muitas outras substancias presentes na água de rio, como microrganismos, agentes redutores, metais dissolvidos entre outras partículas como areia. A molécula pode ter sofrido diversos ataques desde microrganismos até a adsorção na areia, diminuindo a sua disponibilidade na água de rio.

4.3.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

Foram realizados os experimentos de toxicidade utilizando um sistema de aquários com pontos de oxigenação. Este sistema está representado na figura 6 e na imagem 1. Cada aquário continha uma quantidade inicial de 10 peixes machos e 10 peixes fêmeas.

Como descrito anteriormente os animais foram divididos em 5 grupos.

Os animais do grupo de controle negativo e grupo controle, não apresentaram nenhuma alteração comportamento durante as 96 horas de observação. E por este motivo não serão descritas as suas observações.

A primeira avaliação está relacionada apenas com a alteração de comportamento, ou seja, como os animais agiram no tempo de exposição.

Grupo 1: Os machos apresentaram um comportamento arredio e possivelmente sentiram ameaçados no ambiente. A retração dos animais para o fundo do aquário demonstra medo e a junção dos animais em um mesmo lado e próximo a bomba de aeração demonstra a tentativa da união do grupo em se defender e a busca por oxigenação. Os poluentes podem provocar alterações morfológicas das lamelas, a fusão lamelar resultando em uma hipertrofia e hiperplasia epitelial Gill, provocando espessamento da camada de muco que cobre o epitélio branquial (NERO et al., 2006, GIARI et al., 2008) e por este motivo a necessidade de estar próximo a bomba de aeração. As fêmeas não apresentaram nenhuma alteração de comportamento.

Grupo 2: No grupo dois os machos apresentaram a mesma alteração de comportamento. As fêmeas começaram a sentir os efeitos da presença da Tibolona no ambiente porém após algumas horas os animais provavelmente se adaptaram e voltaram a comportamento normal.

Grupo 3: Neste grupo de concentração mais elevada de Tibolona, machos e fêmeas sentiram os efeitos da contaminação da água. Ambos os sexos se mantiveram na

superfície do aquário a maior parte do tempo de observação. Este comportamento indica a busca pelo oxigênio.

A segunda avaliação está relacionada apenas com a alteração de movimentação, ou seja, como estava o nado dos animais no tempo de exposição.

Grupo 1: Os machos inicialmente não apresentaram alteração na velocidade nem na direção de movimento. Após as 12 horas de exposição os machos tiveram uma redução na velocidade de nado, se movimentando vagorosamente. As Fêmeas do grupo 1, novamente não apresentaram nenhuma alteração de movimentação.

Grupo 2: Nas primeiras horas 20% dos peixes machos tiveram paralisia do nado e retornando à sua movimentação normal na terceira hora de exposição. Nas observações de 12 a 96 horas 70% dos animais apresentaram dificuldades de nado, perda da orientação e equilíbrio nadando com ventre para cima ou em espiral. As fêmeas iniciaram as alterações na terceira hora de exposição e até o fim dos 5 dias, 60% dos animais apresentaram a perda do equilíbrio e orientação de nado.

Grupo 3: No grupo de maior contaminação fêmeas e machos apresentaram grandes dificuldades de nado e perda da orientação e equilíbrio nas primeiras 24 horas de exposição.

Os distúrbios e dificuldades de natação dos peixes são facilmente notados após a exposição a poluentes e água. Estas alterações podem ser desencadeadas por diferentes origens, mas que atingem sempre o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico. Podem atacar também o sistema respiratório e rotas metabólicas, provocando falta de energia para natação (GLUSCZAK et al., 2006, WINKALER et al., 2009)

Foram observadas também, as alterações físicas dos animais enquanto estavam em exposição. Alterações como midríase e escurecimento de tecido foram as alterações mais observadas.

Grupo 1: Até a sexta hora de exposição os 30% dos machos apresentaram midríase ou escurecimento de escamas. Esta quantidade de alterações se repetiram para as fêmeas.

Grupo 2: No grupo de concentração intermediária da Tibolona, as observações se restringiram apenas a midríase com alcance de 30% dos animais, tanto machos quanto as fêmeas.

Grupo 3: Neste grupo as alterações atingiram 60% dos animais machos e fêmeas onde se dividiam entre midríase e escurecimento de tecido.

Estas alterações podem estar ligadas a adsorção a pequenas quantidades de gordura presente nas escamas dos animais, ocorrendo a oxidação e escurecimento das escamas. As observações foram realizadas durante as 96 horas de experimentação, porém após as 6 primeiras horas não foi observado alteração das características destes efeitos nem aumento entre os animais.

ARAÚJO, FLYNN, AND PEREIRA apud BIRON e BENEFEY 1994, diz que o cortisol atua como um fator determinante na regulação da coloração da pele do peixe. Estas alterações refletem a interação de vários hormônios como o melanócito, o hormônio concentrador de melanina, melatonina e neurotransmissores como a catecolamina. No entanto com uma exposição prolongada, os níveis de cortisol no plasma são normalizados caracterizando a reversão da cor da pele para a coloração normal.

Foram observadas também a mortalidade dos animais.

Grupo 1: No grupo um não houveram mortes e tanto os animais machos e fêmeas sobreviveram as 96 horas de experimentação.

Grupo 2: Neste grupo durante as 96 horas os machos acumularam uma mortalidade de 70% enquanto as fêmeas apresentaram mortalidade de no máximo 30%.

Grupo 3: Este grupo se apresentou mais agressivo quanto ao nível de mortalidade, para ambos os sexos. Ao fim dos 5 dias chegamos até 90% de morte para os machos e 60% de morte das fêmeas.

Com a inserção dos resultados das três concentrações avaliadas e de todas as outras variáveis entendidas, foi possível com a ajuda do método Trimmed Spearman-Kärber determinar com precisão, por meio de cálculos estatísticos a concentração da Dose Letal e Concentração Letal 50. Como observado experimentalmente foi possível prever que as fêmeas apresentam uma capacidade maior de suportar a Tibolona quando comparado aos machos. Esta característica pode ser influenciada por diversos fatores como por exemplo, as fêmeas apresentam um volume corporal maior, pela rápida ação metabólica das fêmeas quando comparada aos machos, neste item observado as fêmeas defecavam em uma velocidade rápida e com grande volume enquanto os machos não conseguiam ou não tinham esta resposta. Outro fator influenciador é a natureza dos hormônios, por ser um hormônio feminino ele tem ações específicas para humanos do sexo feminino e esta especificidade pode também ter ocorrido nos organismos femininos e indo contra aos organismos masculinos. Para os machos a CL50 foi de 4,39 µg/mL e 4,66 µg/mL para as fêmeas.

Após a determinação da concentração letal e as respostas de disponibilidade da molécula em água pode-se dizer que, extrapolando os dados obtidos nos experimentos físico-

químicos podemos afirmar que temos uma concentração ainda menor capaz de ocasionar a morte de 50% da população. Utilizando o percentual obtido na cromatografia temos que para os machos a concentração letal vai para 2,5 µg/mL e para as fêmeas de 2,65 µg/mL.

4.3.7 Fator de condição alométrico

Foram utilizados os pesos de 100 animais e os comprimentos de cada um.

Na tabela 8 é temos a amplitude total de variação no comprimento e peso dos indivíduos utilizados nos experimentos

Tabela : Amplitude de variação de comprimento e peso.

Parâmetros		Comprimento (cm)				Peso (g)			
Sexo	n	Min	Máx	Media	DP	Min	Max	Media	DP
Machos	50	1,60	2,70	1,98	2,53	0,0533	0,2166	0,104	0,04
Fêmeas	50	2,00	3,40	2,55	3,2	0,1009	0,4250	0,2243	0,076

Como descrito por ARAÚJO, FLYNN, AND PEREIRA, 2011, o coeficiente de alometria e o fator de condição são importantes parâmetros e a forma mais adequada para estimar o peso a partir do comprimento e vice-versa. Na Tabela 9 é possível visualizar a equação logarítmica para cada sexo, os parâmetros a, b e o coeficiente de correlação r^2 .

Tabela : Equação e parâmetros logarítmicos para fator de condição.

Sexo	Equação	a	b	r^2
Masculino	$y = 0,5098\ln(x) + 3,1696$	3,17	0,51	0,52
Feminino	$y = 0,6985\ln(x) + 3,6366$	3,64	0,69	0,62

Citado ainda *apud* ARAÚJO, FLYNN, AND PEREIRA, 2011 um coeficiente angular <3 representa um crescimento alométrico negativo, o que quer dizer que o crescimento é maior em comprimento que em peso.

O fator de condição relativo médio pode nos indicar o grau de bem estar do indivíduo no ambiente. Esta relação deve ser próxima a 1.

O fator de condição relativo (k) está representado na tabela 10.

Tabela : Fator de condição relativo

<i>Animais</i>	<i>K</i>
Machos/fêmeas	1,13

Para que os peixes sejam considerados em ambiente adequado para seu bem estar, esperas um valor próximo de 1. Como resultado obtivemos o valor de 1,13 o que reflete todo o cuidado de aclimatação, alimentação e bons tratos dos animais durante todas as etapas do experimento.

5 CONCLUSÃO

- Após observações constantes das variações de comportamento e atitudes dos animais expostos a contaminação da Tibolona, observar as alterações fisiológicas dos peixes e escurecimento de escamas é possível concluir que a Tibolona apresenta efeito degradante e ativa a percepção de riscos e necessidade de fuga do ambiente contaminado.
- Após a preparação das amostras nas condições descritas para a degradação forçada, foi possível avaliar uma maior resistência da molécula da Tibolona na condição ácida. Com decaimento de 11% nas primeiras horas de contato. Enquanto na condição básica a molécula de Tibolona não resistiu a variação de pH e teve seu pico deslocado ou destruído. Para efeitos de confirmação deve ser analisado possíveis produtos de degradação em um método desenvolvido especificamente para este fim, dessa forma, o que podemos afirmar é que, utilizando o método validado para teor não foi possível avaliar e identificar os picos de degradação formado e sim dizer que a molécula tem fraquezas quando expostas a variações de pH.
- Após a quantificação da presença da Tibolona em água ultra pura é possível concluir que mesmo diluída em solvente orgânico a inserção desta molécula em ambiente polar provoca sua precipitação e a sua dissolução total fica comprometida. A sua disponibilidade no ambiente fica comprometida quando estamos avaliando a sua dissolução no meio aquático. Esta solubilidade teve decaimento de até 43% da concentração inicial o que nos indica uma precipitação de quase metade da concentração. Já para o ambiente contendo uma mistura de substâncias como é o caso da água de rio, essa disponibilidade se tornou ainda menor, chegando a um decaimento de até 88% da concentração inicial. Variáveis como a presença de microrganismos, metais dissolvidos, cloro e tantas outras substâncias em uma mistura que

compõe a água de rio pode ter degradado ou até mesmo aprisionado ou precipitado a molécula de Tibolona deixando disponível 12% da concentração inicial

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após todas as conclusões das observações é possível partir para algumas outras frentes de trabalho afim de determinar a real influência da Tibolona nos organismos vivos aquáticos, desta forma estas são algumas sugestões para trabalhos futuros.

- Desenvolver e validar método de degradação forçada para a Tibolona: este estudo pode indicar como está sendo a degradação da molécula frente as variações de pH e processos oxidativos. Realizando as variações de concentração normal das soluções de estresse e trabalhando também com temperatura e tempo de mistura com solução degradante.
- Expor a Tibolona em ambiente aquático coletando água diariamente e realizando análise cromatográfica: esta avaliação permitirá uma visualização e quantificação real da concentração em que os animais estão sendo expostos e determinar qual o limite seguro da presença da Tibolona em águas, se existir.
- Realizar a exposição utilizando a própria água do rio em que os animais foram coletados: esta exposição será muito importante para entender se a água do rio tem a propriedade de auto depurar a molécula como foram mostrados nas análises em HPLC, e observar se os animais sofrem sua ação em uma mistura de substâncias como é o caso da água de rio.
- Exposição dos animais utilizando a matéria prima em pó, sem diluição e meio orgânico: esta exposição poderá demonstrar qual é a influência da Tibolona nos animais quando ela está no estado sólido, simulando sua precipitação.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERNE, F. O.; ARAUJO, R. T. **Influência da menopausa no padrão sexual: opinião de mulheres.** Revista Saúde. P. 48-60. Bahia. 2007.

AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); Federação das industriais do estado de São Paulo (FIESP); Sindicato da construção de São Paulo (SINDUSCON-SP). **Conservação e reuso de água em edificações.** São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2005.

ALBERTAZZI, P.; MICCO, R. D.; ZANARDI, E.. **Tibolone: a review.** Elsevier Maturitas 30, p. 295-305. 1998.

AMARAL, B. R.. **Degradação eletroquímica de desreguladores endócrinos: o hormônio metiltestosterona.** USP. 2012

AMÉRICO, J. H.P.; MESSIAS, T.G.; TORRES, N.H.; AMÉRICO, G. H. P.. **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana.** Pesticidas ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 22, p. 17-34. 2012.

ARAUJO, G. L. B.. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona.** USP. 2009

ARAUJO, G. L. B.; JUNIOR, A. P.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. O. P.; MATOS, J. R.. **Polimorfismo na produção de medicamentos.** Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Ed. 33, p. 27-36. São Paulo. 2012.

ARAÚJO, C. C. DE; FLYNN, M. N.; PEREIRA, W. R. L. **Fator de condição e relação peso-comprimento de mugil curema valencienners, 1836 (piscis, mugilidae) como indicadores de estresse ambiental.** Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 4, n. 3, p. 51-64, 2011.

ARENZON, A.; NETO, T. J.; GERBER, W.. **Manual sobre Toxicidade em efluentes industriais.** FIERGS. 2010.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências.** Quim. Nova, Vol 30, No. 3, pag: 651-666, 2007. UFRJ. 2007. Rio de Janeiro.

BRASIL A. KRAUSE, G.; RODRIGUES, F. A.. **Recursos Hídricos no Brasil**. 1998.

BRASIL B. **Manual de atenção à mulher no climatério / Menopausa**. Ministério da Saúde. Brasília. 2008

BIRON M AND BENFEY TJ 1994 **Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell)**. Fish Physiol. Biochem. 13 153-160.

BRITO, A. C. F.; PONTES, D. L.. **A Indústria Farmacêutica**. UFRN. 2009.

BRITO, L. T. L.; SILVA, A. S.; PORTO, E. R.. **Disponibilidade de água e gestão dos recursos hídricos**. Disponível em

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/36533/1/OPB1514.pdf> > Acesso em 23/10/2014

CASTRO, C. M. B. **Ocorrência de desreguladores endócrinos em cultura de milho irrigada com efluentes urbanos tratados**. UFRGS. Porto Alegre. 2010

CHISELLI, G.; JARDIM, W. F.. **Interferentes endócrinos no ambiente**. Unicamp. São Paulo. 2007.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. Química Nova, Vol. 31, No 7. 1820-1830. São Paulo. 2008.

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio**. Química Nova na Escola, n. 7. 1998

EDSP. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine Disruptor Screenig**. 2011. Disponível em < <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/whatare.htm> > Acesso em 13/11/2014.

FILHO, E. R. R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M.. **Poluentes Emergentes como Desreguladores endócrinos**. J. Braz. Soc. Ecotoxicol, v. 2, n. 3, p. 283-288. Brasil. 2007.

GALINDO, H. V. C.; SILVA, G. L.; DUARTE, A. D.; SILVA, R. F.. **Identificação de contaminantes emergentes em reservatórios de água para abastecimento humano: Estudo de caso: Reservatório de Taquara Caruaru - PE**. ENEGEP, Rio Grande do Sul. 2012.

GIARI L, SIMONI E, MANERA M AND DEZFULI BS 2008 **Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure.** Ecotoxicol. Environ. Saf. **70** 400-410.

Gluszczak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF and Vieira VLP 2006. **Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*).** Ecotoxicol. Environ. Saf. 65 237-241.

GUIMARÃES, J. R. P. F.. **Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional.** Disponível em <bvsms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_disruptores.pdf> Acesso em 15/11/2014.

ROBERT, K.M.; DAVID , A. B; KATHLEEN, M. B; PETER, J. K; VICTOR, W. R; ANTHONY, W. **Bioquímica ilustrada de Harper (Lange).** Editora Atheneu. 9ª edição. São Paulo. 2002. – 29 ed. P. 146 a 150

KENEMANS, P.; SPEROFF, L.. **Tibolone: Clinical recommendations and practical guidelines a report of the international tibolone consensus group.** Elsevier Maturitas 51, p. 21-28, Portland. 2004.

KLOOSTERBOER, H. J.. **Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone.** Elsevier Maturitas 48. p. S30-S40. 2004.

LIVIAL. **Bula de medicamento LIVIAL.** Laboratório Organon. 2013. Disponível em <<http://www.medicinanet.com.br/bula/3123/livial.htm>> Acesso em 22/11/2014.

LUCINDA, P. H. F. **Family Poeciliidae.** In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR., C. J. (Ed.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Quím. Nova, São Paulo , v. 32, n. 1, 2009 .

MARENGO, J. A.. **Água e mudanças climáticas.** Estud. av., São Paulo , v. 22, n. 63, 2008 .

MARIMON, M. M.; SANSEVERINO, P. B.; BIANCHI, M. S.; WENDER, M. C. O.. **Uso da Tibolona no climatério**. Grupo Editorial Moreira Junior, p. 8-13. Disponível em <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5230> Acesso 15/11/2014

MENEGHIN, L. A.; BORTOLAN, S. **Menopausa e Terapia de Reposição hormonal**. Disponível em <https://www.inesul.edu.br/revista/arquivos/arq-idvol_9_1278355918.pdf> Acesso 22/11/2014

MORRAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q.. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana**. Ver. Saúde Pública 2002. Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. 2002

Nero V, Farwell A, Lister A, Van der Kraak G, Lee LEJ, Van Meer T, MacKinnon MD and Dixon DG 2006 **Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water**. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63 365-377.

PEDRO, A. O.; NETO, A. M. P.; PIAVA, L. H. S. C.; OSIS, M. J.; HÁRDY, E.. **Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar**. Departamento de Tocoginecologia. Faculdade de Ciências Médicas. Unicamp, SP. 2003

PROSAB, PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO. **Manejo de águas pluviais urbanas**. Disponível em < www.finep.gov.br/prosab/livros/prosab5_tema%204.pdf > Acesso em 12/11/2014.

ROHDEN, F. **O Império dos hormônios e a construção da diferença entre os sexos**. UERJ. 2008.

ROSA, H. B.; TOLOTTI, R. C.; **Desenvolvimento e validação de método para o doseamento de tibolona em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2012.

RYMER, J. **Why tibolone is different?**. Reviews in Gynaecological Practice. Elsevier Science. 2002

SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C.. **Desreguladores Endócrinos no meio ambiente e o uso de potenciais bioindicadores**. Revista eletrônica TECCEN, Vassouras, v.4, n.3, p. 33-48, 2011.

SHIKLOMANOV, I. A., 1999. **World water resources at the beginning of the 21st century.** State hydrological Institute - SHI, UNESCO/IPH. Disponível em <<http://webworld.unesco.org/water/ihp/db/shiklomanov/summary/html/summary.html>> Acesso em 23/10/2014.

SILVA, B. T.; BORGES, M. M. M. C.; **Sexualidade após a menopausa: Situações vivenciadas pela mulher.** Revista Enfermagem Integrada, V.5, N.2. Ipatinga. 2012. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Disponível em <http://www.sbemrj.org.br/micropoluentes_no_meio_ambiente.html> acesso em 12/11/2014

SOUZA, C. N.. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais.** UFCE. Fortaleza. 2011.

SOUZA, F.; TOZZO, R. A.; **Poecilia Reticulata Peters 1859 (Cyprinodontiformes, poeciliidae) como possível bioindicador de ambientes degradados.** Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade, vol. 3, n. 2, Paraná. 2013

VALERIO, S. B.; SUAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E.. **Aspectos da biologia populacional de Poecilia Reticulata (Peters, 1859) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) no riacho Paragem, Dourados - MS.** Mato Grosso do Sul. Disponível em <www.uems.br/portal/biblioteca/repositorio/2012-07-06_16-44-03.pdf> Acesso 12/11/2014.

VARGAS, C. M.. **Gerenciamento integrado dos recursos hídricos como problema socioambiental.** Ambientes da Sociedade. Ano II. 1999.

VASCONSELLOS, D.; NOVO, R. F.; CASTRO, O. P.; DURY-VION, K.; RUSCHEL, A.; COUTO, M. C. P. P; GIAMI, P. C. A.. **A sexualidade no processo do envelhecimento: novas perspectivas - comparação transcultural.** Estudos de Psicologia, p. 413-419. Paris. 2004
Viola, H. Gestão de águas pluviais em áreas urbanas - O estudo de caso da cidade do samba. UFRJ, Rio de Janeiro. 2008.

WEHBA, S.; MACHADO, R. B.; FERNANDES, C. E.; FERREIRA, J. A.; MELO, N. R.; ALDRIGHI, J. M.; BARACAT, E. C.. **Aspectos clínicos e Metabólicos de mulheres na Pós-menopausa tratadas com tibolona.** RBGO, ed. 27, p. 37-41. São Paulo. 2000.

WINKALER EU, SILVA AG, GALINDO HC AND MARTINEZ CBR 2001 **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de**

Londrina, Estado do Paraná. Acta Sci. 23 507-514.