

I-331 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDÓCRINA DO ETINILESTRADIOL PRESENTE NA ÁGUA PARA CONSUMO

Raissa Vitareli Assunção Dias⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Saneamento no Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Patrícia Martins Parreiras⁽²⁾

Médica veterinária pela UFMG. Mestrado e doutorado em Ciência Animal pela UFMG. Tecnologista em Saúde Pública no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/Minas)

Olindo de Assis Martins Filho⁽³⁾

Bioquímico pela Universidade Federal de Ouro Preto. Mestrado e doutorado em Bioquímica e Imunologia pela UFMG. Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz e Chefe do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração no CPqRR da FIOCRUZ/Minas

Valter Lucio de Padua⁽⁴⁾

Engenheiro Civil pela UFMG, mestrado e doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Professor Associado do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

Endereço⁽¹⁾: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Escola de Engenharia, Bloco 1 - sala 4402A. Av. Presidente Antonio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte, MG, Brasil. CEP:31270-901 - Telefone: (31) 3409-1018 - e-mail: raissa.vitareli@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos indicam que a exposição a químicos ambientais não só afeta diretamente a saúde dos indivíduos expostos, mas também pode induzir, nas gerações subsequentes, efeitos distintos daqueles associados com a exposição primária. Os efeitos causados ao longo de sucessivas gerações ainda necessitam ser esclarecidos e neste trabalho avaliaram-se os possíveis efeitos causados devido à exposição direta ao etinilestradiol (EE2) quando presente na água de consumo e também aqueles efeitos provenientes da exposição a longo prazo. Para avaliação da atividade endócrina do EE2 na água para consumo, foram realizados ensaios *in vivo* em laboratório, com o objetivo de verificar possíveis alterações de peso corporal em camundongos que receberam água com concentrações conhecidas desse composto. Tendo em vista que estudos experimentais e epidemiológicos apontam para efeitos sobre o sistema endócrino após uma exposição crônica ao EE2, foram analisados os possíveis danos com relação ao peso corporal de machos e fêmeas em três gerações. Camundongos foram utilizados por serem animais de pequeno porte, prolíferos, com curto período de gestação, fácil manejo e manutenção. Como resultado, os camundongos que ingeriram água com EE2 em todas as concentrações testadas (10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 ng/L) apresentaram diminuição de peso em comparação com o grupo controle (água sem EE2). Semelhante a outros microcontaminantes emergentes, o EE2 tem se mostrado resistente aos processos usuais de tratamento de água e esgoto e, portanto, faz-se necessária a realização de pesquisas que forneçam subsídios técnicos para esclarecer em quais concentrações e quais os efeitos que o EE2 presente na água pode causar à saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Interferentes endócrinos, água para consumo humano, etinilestradiol, peso corporal.

INTRODUÇÃO

Os interferentes endócrinos (IE) também podem ser encontrados como sinônimos de perturbadores endócrinos, disruptores endócrinos e agentes hormonalmente ativos que na literatura internacional correspondem aos *endocrine disrupting chemicals* (EDC). De acordo com Damstra *et al.* (2002), IE “é uma substância ou mistura exógena que altera funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, seus descendentes, ou (sub)populações” e esta foi a definição adotada pelo Programa Internacional de Segurança Química – PISQ (WHO, 2012). De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2009), IEs são produtos químicos sintéticos que perturbam funções endócrinas normais do sistema em seres humanos e animais selvagens, bloqueando ou imitando hormônios naturais. A

Comunidade Européia (2012) entende que a definição desses compostos estende-se também sobre os efeitos adversos que os IEs podem causar à prole dos organismos expostos.

A preocupação com os microcontaminantes emergentes, especialmente os IEs, cresceu mais rapidamente a partir da década de 1990. Nesse período, houve a divulgação do trabalho de pesquisadores ingleses no qual foi demonstrado um aumento nos níveis da proteína responsável pela produção de ovos (vitelogenina - VTG) em peixes machos capturados próximos ao ponto de lançamento do efluente de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) (TYLER *et al.*, 1998). Apesar do crescente interesse pelo tema, ainda não estão totalmente estabelecidos quais os reais riscos associados à presença desses hormônios no ambiente, gerando preocupação a respeito de como essas substâncias interferem no sistema endócrino quando presentes na água de consumo (JURADO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

Além da ausência de informações sobre os efeitos causados por microcontaminantes emergentes, os riscos de doenças devido aos IEs podem ser significativamente subestimados. As doenças causadas por exposição a esses poluentes podem não ser causadas por somente um analito e sim por uma mistura deles que pode ter efeito sinérgico. A fim de minimizar os riscos de tal cenário, ações governamentais, como proibição ou limitação do uso de certos compostos, reduzem a exposição em humanos e animais (WHO, 2012).

Segundo Pocar (2011), a exposição a químicos ambientais no período de desenvolvimento das gônadas não só afeta diretamente a saúde reprodutiva dos indivíduos expostos, mas também pode induzir, nas gerações subsequentes, efeitos distintos daqueles associados com a exposição primária. Os mecanismos de transmissão ao longo de sucessivas gerações ainda necessitam ser melhor esclarecidos e neste trabalho pretendeu-se avaliar os efeitos causados devido à exposição direta ao EE2 quando presente na água de consumo e também aqueles efeitos provenientes da exposição a longo prazo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação da atividade estrogênica do EE2 na água para consumo foram realizados ensaios *in vivo* em laboratório com o objetivo de verificar possíveis alterações em camundongos que receberam água com concentrações conhecidas dessa substância. Tendo em vista que estudos experimentais e epidemiológicos apontam para efeitos sobre o sistema endócrino após uma exposição crônica, foram analisados os possíveis danos com relação ao peso corporal de machos e fêmeas em três gerações.

Para os ensaios experimentais, camundongos heterogênicos da espécie *Mus musculus* linhagem *Swiss webster* foram mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR. Com base nos resultados de estudos obtidos em camundongos, alterações detectadas em experimentos com estes animais podem sugerir também alterações em humanos sob condições semelhantes.

Inicialmente, foram utilizados 120 camundongos, 60 machos e 60 fêmeas, oriundos do Biotério de Produção – BIOT do CPqRR, pesando aproximadamente 10-12g com 21 dias de idade e essa foi denominada a geração F(0). Os animais foram mantidos nas dependências do Biotério de Experimentação – BIOTEX do CPqRR que possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nível 2 (CQB n°2). As condições ambientais foram controladas mantendo-se a temperatura ambiente em torno de $22\pm2^{\circ}\text{C}$ e períodos de luz claro/escuro de 12 horas. Ao longo de todo o experimento a troca de água foi realizada três vezes por semana, a pesagem dos animais uma vez por semana e os mesmos foram avaliados diariamente por médico veterinário quanto ao comportamento geral e estresse, detecção de *end point* do experimento.

Todos os animais gerados ao longo do experimento e aqueles da geração F(0) receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os sinais clínicos que determinaram a eutanásia de camundongos antes do final do experimento, antecipando o *end point* do ensaio, com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais foram: apatia, perda de apetite e emagrecimento, desidratação, sinais de dor, piloereção e animal isolado do grupo.

Foram formados aleatoriamente cinco grupos com 24 animais cada, 12 machos e 12 fêmeas (Figura 1). Quatro grupos denominados A, B, C e D foram tratados com água com concentrações conhecidas de EE2. O quinto grupo, chamado ZERO, foi o controle que recebeu água sem EE2. Todas as alterações observadas nos grupos anteriores (A, B, C e D) foram comparadas com os animais do grupo ZERO afim de que pudessem ser

atribuídas a presença do EE2 na água. Os 12 machos e 12 fêmeas de cada grupo foram mantidos separados por sexo até que ocorresse o acasalamento. Esses procedimentos foram aplicados a todas as gerações - F(0), F(1) e F(2) - e foram divididos em duas etapas que são detalhadas a seguir: fornecimento de água e acasalamento.



Figura 1: Camundongos acomodados em caixas dentro de cada grupo de tratamento

FORNECIMENTO DE ÁGUA

Para determinar a concentração exata de EE2 e evitar a interferência de outros microcontaminantes, a água fornecida aos animais foi enviada para análise cromatográfica antes do início do experimento. Foi confirmada a detecção esperada de IEs e fármacos abaixo do limite de detecção (LD), visto que foi fornecida água Milli-Q aos camundongos. As soluções administradas aos grupos A, B, C e D foram preparadas a partir da diluição do padrão puro da substância em água Milli-Q. As concentrações foram crescentes, sendo a menor delas igual 10^2 ng/L e a partir dessa as outras três concentrações foram 10, 100 e 1.000 vezes maiores. As concentrações testadas nos animais estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de etinilestradiol aplicadas nos ensaios *in vivo*

Grupos	Concentração de EE2 (ng/L)
A	10^2
B	10^3
C	10^4
D	10^5
ZERO	sem EE2

Os animais da geração F(0) que receberam o tratamento proposto a partir do primeiro dia de chegada ao Biotério (21 dias de idade) foram separados em caixas conforme o sexo e identificados individualmente.

ACASALAMENTO

Assim que os machos e fêmeas de cada grupo atingiram a maturidade sexual, os animais foram colocados para acasalamento, sendo o dia posterior a este evento considerado DPC=0 (dia pós-coito). A geração seguinte, F(1), também foi colocada para acasalamento assim como ocorreu na geração (F0). A cada geração, 50% da prole foi utilizada para formar novos casais aleatoriamente dentro dos cinco grupos. Outros 25% foram sacrificados e os 25% restantes foram mantidos sob tratamento. Devido à natureza do experimento, o número de animais nascidos durante o experimento variou em cada geração e em cada grupo. A Figura 2 é um esquema que representa cada um dos cinco grupos de tratamento (A, B, C, D e ZERO) considerando-se que cada ninhada seria composta por 8 filhotes.

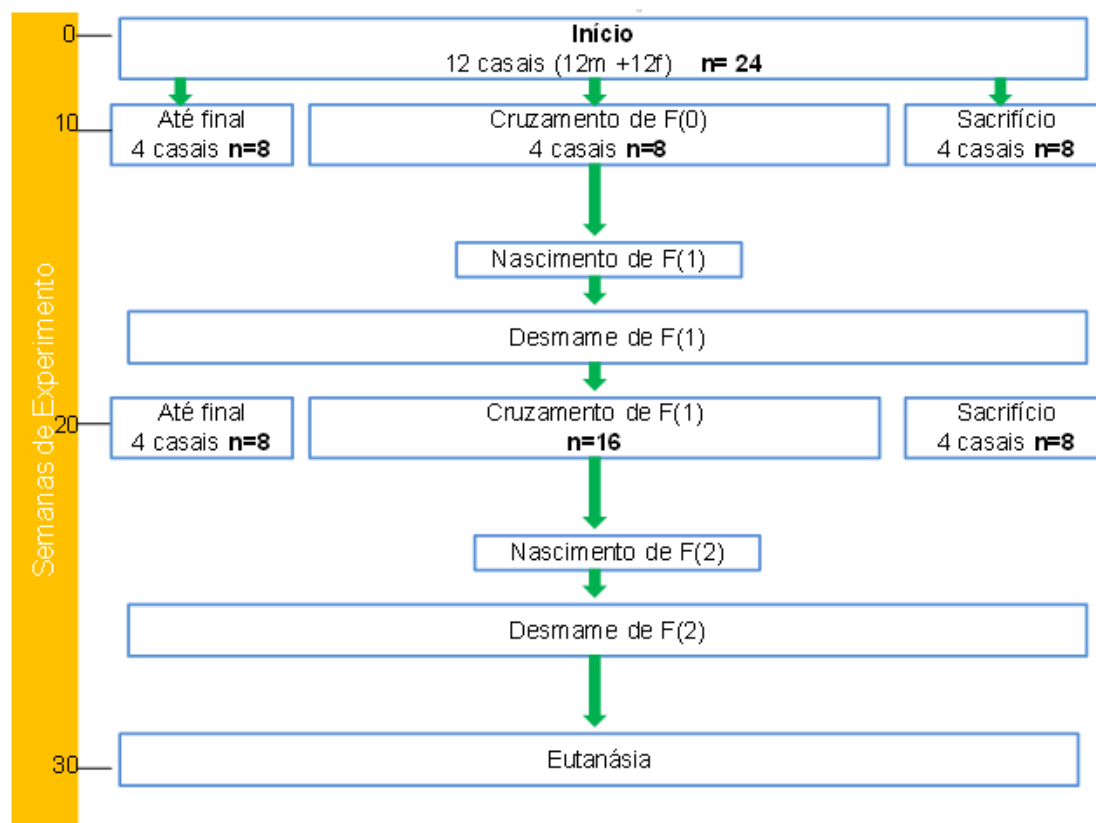


Figura 2: Esquema dos ensaios *in vivo* em cada grupo de tratamento

A confirmação da cópula foi pela presença de tampão vaginal nas fêmeas quando mantidas com os machos. Caso não houvesse a presença de tampão, os casais eram colocados juntos novamente nos dias posteriores, até que houvesse a cobertura. A partir do DPC=0, teve início a contagem do período gestacional que é de 19-21 dias. Após a confirmação do acasalamento, fêmeas e machos foram separados em ambientes distintos (um animal/caixa) até o final do experimento.

Para animais gerados durante o experimento, logo após o desmame (21 dias após o nascimento), os indivíduos das gerações subsequentes foram separados por sexo, dentro de cada ninhada e de cada grupo. Para evitar a endogamia, os animais colocados para acasalamento eram provenientes de diferentes matrizes dentro do mesmo tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentadas, respectivamente, as estatísticas descritivas do peso corporal de fêmeas e machos avaliados nos ensaios com camundongos.

Tabela 3: Estatística descritiva do peso corporal (g) de camundongos fêmeas para cada grupo de tratamento, geração e tempo de exposição

Grupo de tratamento	Geração/ tempo de exposição	N _d	Mín	Méd	MédG	Medn	Má x	DP	CV
Z	F(0) 10 semanas	4	26	34	34	36	38	6	0,16
	F(0) 20 semanas	4	32	37	37	35	45	6	0,15
	F(0) 30 semanas	4	35	38	38	39	40	2	0,05
	F(1) 10 semanas	16	34	46	46	48	57	6	0,13
	F(2) 10 semanas	19	33	38	38	38	42	3	0,07
A	F(0) 10 semanas	4	23	25	25	24	25	3	0,12
	F(0) 20 semanas	3	26	33	32	29	43	9	0,28
	F(0) 30 semanas	4	30	36	36	36	40	4	0,12
	F(1) 10 semanas	9	41	43	43	43	48	2	0,05
	F(2) 10 semanas	24	18	31	30	33	44	8	0,24
B	F(0) 10 semanas	4	24	30	30	31	35	4	0,14
	F(0) 20 semanas	4	42	44	44	43	45	1	0,02
	F(0) 30 semanas	4	32	44	43	47	49	8	0,18
	F(1) 10 semanas	3	39	42	42	41	45	3	0,07
	F(2) 10 semanas	12	23	30	29	30	35	5	0,15
C	F(0) 10 semanas	4	26	32	31	33	36	5	0,14
	F(0) 20 semanas	4	33	38	38	37	43	4	0,11
	F(0) 30 semanas	4	41	42	42	41	44	1	0,03
	F(1) 10 semanas	13	33	44	44	45	55	7	0,15
	F(2) 10 semanas	12	23	31	31	31	37	5	0,15
D	F(0) 10 semanas	4	23	24	24	23	25	0,9	0,03
	F(0) 20 semanas	3	30	36	36	38	40	6	0,15
	F(0) 30 semanas	4	33	36	36	34	44	5	0,12
	F(1) 10 semanas	4	38	39	39	39	40	1	0,03
	F(2) 10 semanas	1	24	24	24	24	24	0	0,00

*Z = controle (sem EE2); A = 10²ng/L EE2; B = 10³ng/L EE2; C = 10⁴ng/L EE2; D = 10⁵ng/L EE2; CV = Coeficiente de variação; DP = Desvio-padrão; Máx = Máximo; Mín = Mínimo; Méd = Média aritmética; MédG = Média geométrica; Medn = Mediana; N_d = número de dados válidos; NC = não calculável

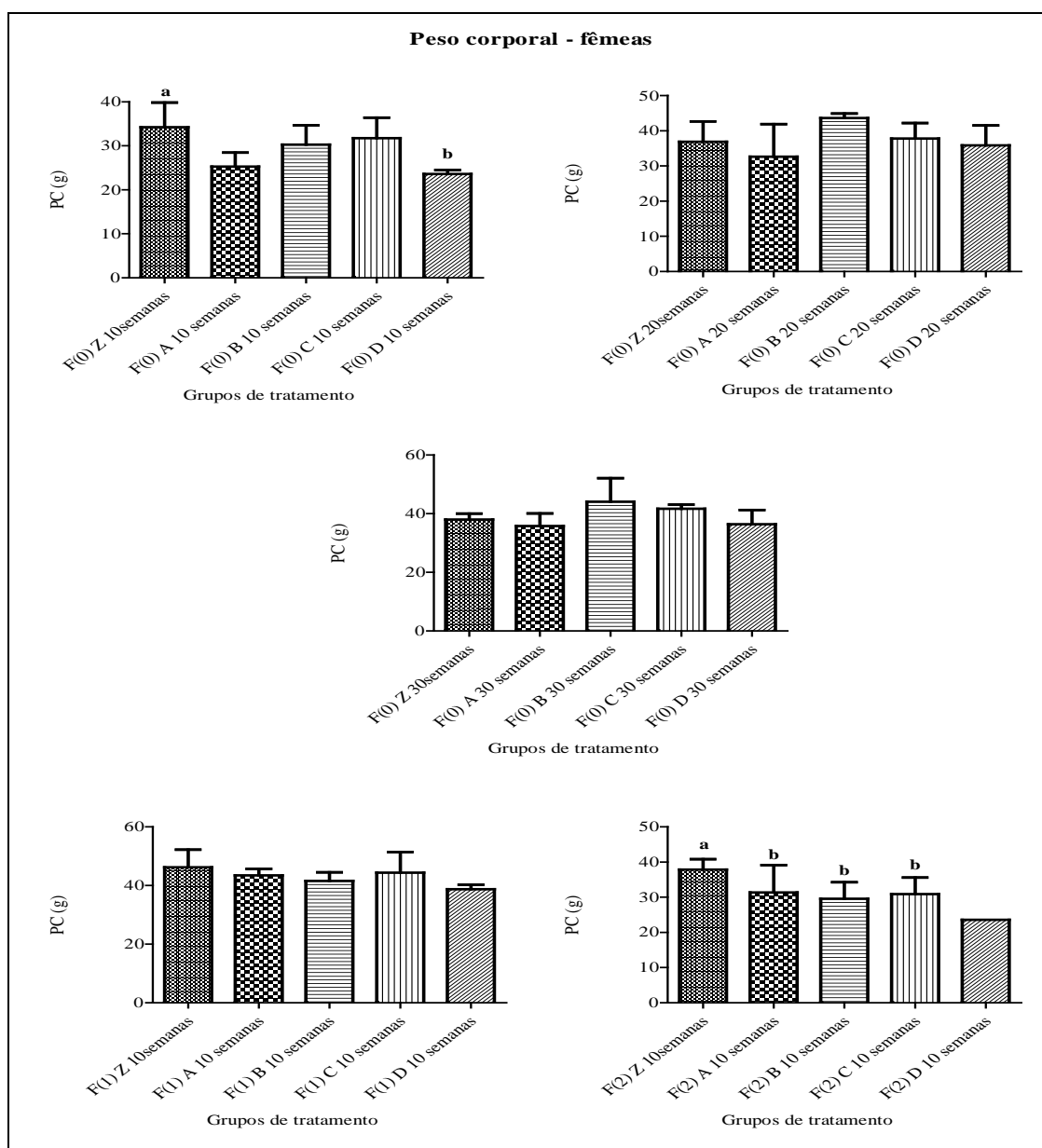
Tabela 4: Estatística descritiva do peso corporal (g) de camundongos machos para cada grupo de tratamento, geração e tempo de exposição

Grupo de tratamento	Geração/ tempo de exposição	N _d	Mín	Méd	MédG	Medn	Má x	DP	CV
Z	F(0) 10 semanas	4	32	36	36	36	39	3	0,08
	F(0) 20 semanas	4	31	43	42	46	50	8	0,19
	F(0) 30 semanas	4	40	46	46	45	55	7	0,14
	F(1) 10 semanas	6	45	50	50	50	54	3	0,06
	F(2) 10 semanas	15	37	43	43	43	51	4	0,08
A	F(0) 10 semanas	4	35	41	41	41	48	6	0,13
	F(0) 20 semanas	4	31	42	42	45	47	7	0,17
	F(0) 30 semanas	4	36	44	44	46	49	6	0,12
	F(1) 10 semanas	10	35	45	44	44	60	7	0,16
	F(2) 10 semanas	18	24	38	37	40	48	7	0,19
B	F(0) 10 semanas	4	31	34	34	34	37	3	0,10
	F(0) 20 semanas	4	42	47	46	45	54	6	0,11
	F(0) 30 semanas	3	38	45	44	45	51	7	0,14
	F(1) 10 semanas	5	46	50	50	52	54	4	0,07
	F(2) 10 semanas	8	26	31	31	31	36	3	0,09
C	F(0) 10 semanas	4	23	34	33	35	43	9	0,26
	F(0) 20 semanas	4	41	46	45	46	39	3	0,06
	F(0) 30 semanas	4	43	50	49	49	58	6	0,12
	F(1) 10 semanas	7	32	45	45	47	57	3	0,17
	F(2) 10 semanas	11	27	32	32	31	39	4	0,12
D	F(0) 10 semanas	4	21	24	24	25	27	3	0,11
	F(0) 20 semanas	4	32	41	40	42	48	7	0,16
	F(0) 30 semanas	4	31	38	38	39	42	5	0,14
	F(1) 10 semanas	6	45	46	46	46	48	1	0,02
	F(2) 10 semanas	3	21	24	24	24	26	3	0,10

*Z = controle (sem EE2); A = 10²ng/L EE2; B = 10³ng/L EE2; C = 10⁴ng/L EE2; D = 10⁵ng/L EE2; CV = Coeficiente de variação; DP = Desvio-padrão; Máx = Máximo; Mín = Mínimo; Méd = Média aritmética; MédG = Média geométrica; Medn = Mediana; N_d = número de dados válidos; NC = não calculável

Foi aplicado o teste *Kruskal-Wallis* ($\alpha=5\%$) para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que receberam água com EE2 (A, B, C e D) em relação ao grupo controle (Z), sem EE2. Para avaliar as diferenças entre as concentrações de etinilestradiol, verificaram-se possíveis alterações na mesma geração e com animais da mesma idade a fim de obter um padrão entre as comparações.

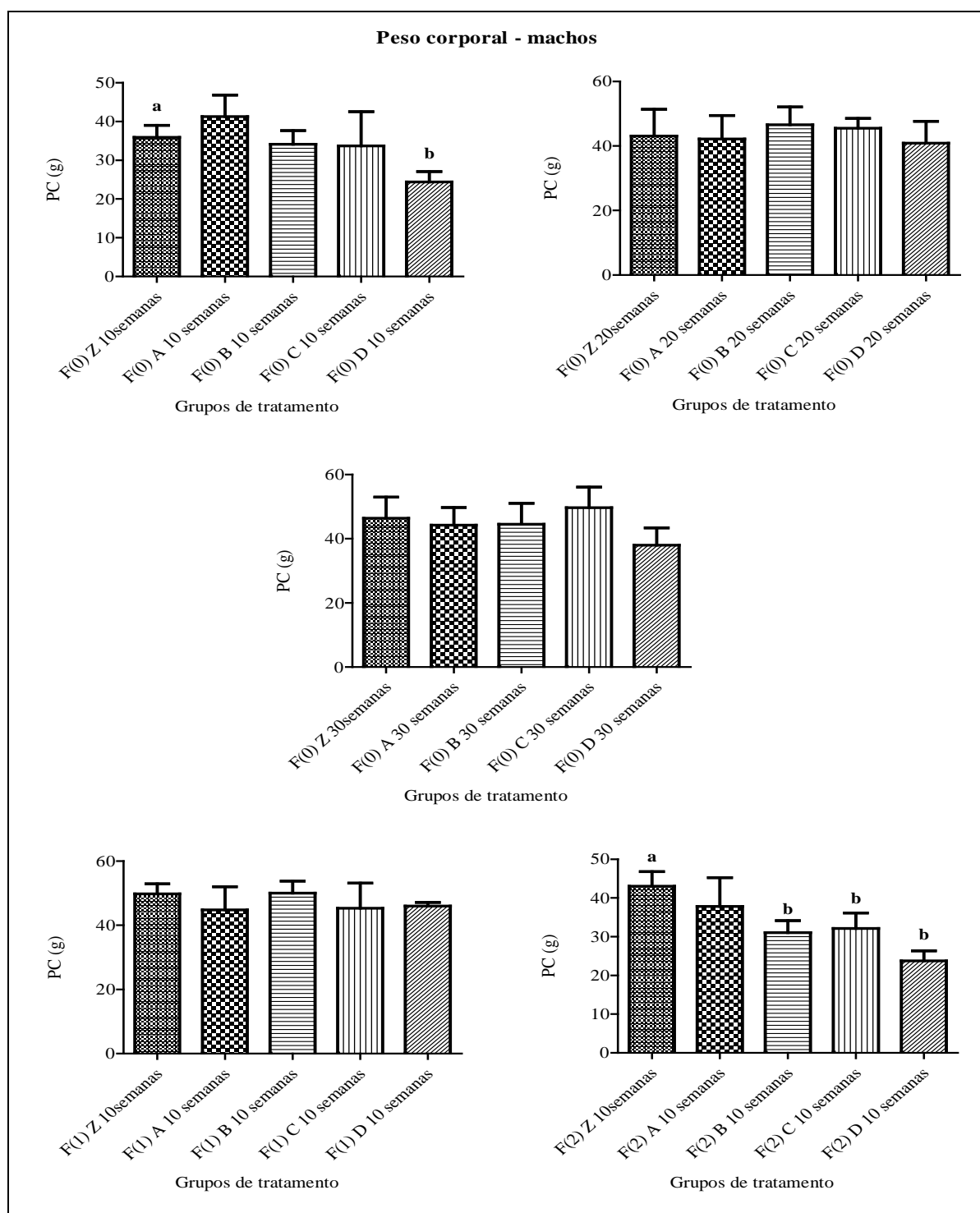
Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os gráficos de peso corporal dos animais de acordo com as dosagens de EE2 adicionadas à água.



*Z = controle (sem EE2); A = 10^2 ng/L EE2; B = 10^3 ng/L EE2; C = 10^4 ng/L EE2; D = 10^5 ng/L EE2

**Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos de tratamento

Figura 4: Média e desvio padrão do peso corporal de camundongos fêmeas



*Z = controle (sem EE2); A = 10^2 ng/L EE2; B = 10^3 ng/L EE2; C = 10^4 ng/L EE2; D = 10^5 ng/L EE2
**Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos de tratamento

Figura 5: Média e desvio padrão do peso corporal de camundongos machos.

Para os animais com 10 semanas de idade da primeira geração, verificou-se diferenças significativas entre as fêmeas que tomaram maior dosagem e às pertencentes ao grupo controle. Aquelas que tomaram água com concentração de 10^5 ng/L de EE2 apresentaram peso corporal menor do que as que tomaram água sem o hormônio. Para as fêmeas de 10 semanas da terceira geração, F(2), os grupos que tomaram água com EE2

também apresentaram menor peso corporal, havendo diferenças significativas entre o grupo controle e os que tomaram três dosagens (10^2 , 10^3 e 10^4 ng/L).

Para os machos, o efeito foi semelhante e houve diferenças nos animais de 10 semanas de idade das gerações F(0) e F(2). Na primeira geração, os animais que receberam maior dosagem apresentaram menor peso em relação ao controle; e na geração F(2) a diferença em relação ao controle se estendeu para as três maiores dosagens (10^3 , 10^4 e 10^5 ng/L).

Apesar de estudos anteriores sugerirem alterações no sistema reprodutor devido à exposição ao EE2, a diminuição do peso também indica a interferência deste analito no sistema endócrino tanto de machos quanto de fêmeas. A mínima concentração na qual se detectou diminuição de peso foi de 10^2 ng/L. Esses resultados corroboram informações de Lyons (2008), que verificaram diminuição do peso de roedores expostos ao ambiente com IEs.

A concentração do EE2 detectada em mananciais de abastecimento tem sido relatada desde valores inferiores ao limite de detecção (4,63 ng/L) a até $4,3 \times 10^3$ ng/L. Esse valor foi encontrado em água superficial no Brasil (RAIMUNDO, 2007) e corresponde a uma concentração da ordem de 100 a 1000 vezes superior à usualmente reportada em publicações internacionais. Valores semelhantes foram encontrados por Ghiselli (2006), também relativos a um estudo realizado no Brasil, na bacia do rio Atibaia em São Paulo, enquanto que Moreira *et al.* (2008) encontraram valores de 3,0 a 54,0 ng/L em mananciais da região metropolitana de Belo Horizonte. Conforme relatado anteriormente, a mínima concentração na qual se detectou diminuição de peso no presente trabalho foi de 10^2 ng/L.

O lançamento de substâncias hormonalmente ativas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar sérios impactos sobre a dinâmica e estrutura das populações aquáticas (FOLMAR *et al.*, 2002). Estudos realizados no Canadá indicaram pela primeira vez que concentrações do 17α -etinilestradiol iguais às encontradas nas proximidades de lançamentos de efluentes (5-6 ng/L) levaram ao colapso as populações de peixes existentes em lagos experimentais (PELLEY, 2003).

CONCLUSÕES

Várias pesquisas têm contribuído para melhorar a compreensão dos impactos dos IEs sobre a saúde humana e dos animais selvagens. Recentes publicações científicas como da Sociedade de Endocrinologia (2009), Comissão Europeia (2011), Agência Europeia de Meio Ambiente (2012) e a Organização Mundial da Saúde (2012) relataram a complexidade desse tema com várias lacunas a serem esclarecidas. No entanto, tais documentos concluíram que há muitas evidências sobre efeitos adversos (infertilidade, câncer, malformações) que esses compostos podem causar devido à exposição ambiental; e relataram também evidências de possíveis efeitos também na tireoide, função cerebral e metabolismo da glicose.

Em relação aos ensaios *in vivo* realizados na presente pesquisa, os camundongos que ingeriram água com EE2 em todas as concentrações apresentaram diminuição de peso em comparação com o grupo controle.

Assim como outros microcontaminantes emergentes, o EE2 tem se mostrado resistente aos processos usuais de tratamento de água e esgoto. Em vista disso, há risco de contaminação de corpos d'água que recebem esses efluentes ou esgoto *in natura* ou ambos. Como muitos mananciais superficiais são fontes de captação de água para consumo humano, caso haja contaminação e a ETA não consiga remover esses poluentes de modo eficiente, o consumo da água poderá, em longo prazo, colocar em risco a saúde da população. Portanto, faz-se necessária a realização de mais pesquisas que forneçam subsídios técnicos para esclarecer em quais concentrações e quais os efeitos que o EE2 e outros IEs presentes na água podem causar à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COMMUNITY EUROPEAN. *The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments*. The Weybridge+15 (1996–2011) report, 2012.
2. DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; KRAAK, G. V. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. In: World Healthy Organization, 2002.
3. EPA (United States Environmental Protection Agency). *Nutrient control design manual: state of technology review report*. The Cadmus Group, Inc., 2009, 104 p.
4. FOLMAR, L. C., HEMMER, M. J., DENSLOW, N. D. A Comparison of the Estrogenic Potencies of Estradiol, Ethynylestradiol, Diethylstilbestrol, Nonylphenol and Methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, v. 60 (1-2), p. 101-110, 2002.
5. GHISELLI, G. *Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP)*. 2006. 181 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
6. JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, A.; ALDA, M. L.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment* v. 440, p. 82–94, 2012.
7. LYONS GWYNNE. Effects of pollutants on the reproductive health of male vertebrate wildlife – males under threat. *ChemTrust*. 2008. 48p.
8. MOREIRA, D. S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F.; SANTOS, E. P.P. C.; PÁDUA, V. L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Área, Brasil. *Environmental Technology*, v. 10, n. 10, p. 1041-1049, 2008.
9. PELLE, J.; Estrogen knocks out fish in whole-lake experiment. *Environ. Sci. Technol.* v. 37, p. 313^a, 2003.
10. POCAR, P.; FIANDANESE, N.; SECCH, C.; BERRINI, A.; FISCHER, B.; SCHMIDT, J. S.; SCHAEDELICH, K.; RHIND, S. M.; ZHANG, Z.; BORROMEO, V. Effects of polychlorinated biphenyls 1 in cd-1 mice: reproductive toxicity and intergenerational transmission. *Toxicological Sciences*. p. 1-47, 2011.
11. RAIMUNDO, C. C. M. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia*. 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
12. SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*, v165, p. 38-58, 2012.
13. TYLER, C. R. E ROUTLEDGE, E. J. O Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, n. 9, p. 1795 – 1804, 1998.
14. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). State-of-the-science of endocrine disruptors. Summary for Decision-Makers, 2012.