

A PRESENÇA DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS E DE ABASTECIMENTO: UM PROBLEMA DA VIDA MODERNA?

**Ana Paula Simões, Marcela Silva, Narjara Mange, Vitor Hugo Feitosa, Thaís Cardoso e
Gilson Alves Quinágia**

Engenharia Ambiental das Faculdades Oswaldo Cruz, Rua Brigadeiro Galvão, 540, Prédio 4,
CEP 01151-000, São Paulo - SP

INTRODUÇÃO

O presente artigo trata de substâncias que podem interferir no sistema endócrino, denominadas de Interferentes Endócrinos (IE), estes, mesmo em níveis baixíssimos podem causar diversos problemas tanto em animais como nos seres humanos.

Presentes no corpo humano mimetizam a ação dos hormônios secretados para a regulação do funcionamento adequado dos órgãos responsáveis por funções específicas.

São diversos os tipos de substâncias que podem se tornar um IE, como plastificantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas etc. O comportamento dos IE no meio ambiente está totalmente ligado com suas propriedades físicas e químicas.

Muitas dessas substâncias competem com os hormônios sexuais femininos e masculinos, exercendo efeitos de feminização ou masculinização dos seres.

O fato de que grande parte dos compostos chamados interferentes endócrinos terem como destino final os sistemas de águas naturais, tem motivado muitos trabalhos para comprovar os efeitos causados pela exposição aos IE frente à biota, principalmente a aquática. Afetando toda a cadeia alimentar por serem bioacumulativos e biomagnificados.

Os IE são identificados através de sua concentração, que por serem baixas exigem métodos mais complexos de análise. A diversidade de características de cada interferente exigirá um tratamento específico para uma remoção eficaz.

Tais metodologias para estas finalidades serão abordadas neste trabalho, de forma a subsidiar a informação das pesquisas mais atuais e a importância de sua aplicação nos processos para a detecção e remoção de IE na água para o consumo humano.

O QUE SÃO INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Existem muitas definições para essas substâncias, que são mundialmente conhecidas como *endocrine disruptors* (EDs) ou *endocrine disrupting compounds or chemicals* (EDCs). Na tradução para a língua portuguesa podemos encontrar como **interferentes endócrinos, desreguladores endócrinos, xenoestrogênios, fitoestrogênios, disruptores endócrinos, estrogênios ambientais**, dentre outras (GHISELLI; JARDIM, 2007). Neste artigo, será adotado o termo interferentes endócrinos (IE).

Os interferentes endócrinos (IE) são substâncias que podem interferir no sistema endócrino de seres vivos, incluindo os seres humanos. Estes podem ser sintéticos ou naturais e mesmo em pequenas proporções, podem causar diversos problemas como feminilidade dos peixes, problemas na reprodução como diminuição de espermatozoide e até mesmo câncer.

De acordo com Sodré et al. (2007), levando em considera o as mudanças causadas no sistema endócrino, diversas substâncias de origem antrópica (xenoestrog nio) ou naturais (fitoestrog nios) podem ser classificadas como IE. Os IE podem se comportar tanto como estrog nios ou como androg nios. Os estrog nios são hormônios que regulam o desenvolvimento sexual feminino e suas fun oes reprodutivas, já os androg nios são hormônios responsáveis pelas características sexuais masculinas.

SISTEMA ENDÓCRINO

O Sistema Endócrino   composto por glândulas e tecidos que secretam substâncias químicas responsáveis pelo controle da maioria das fun oes biológicas. As substâncias secretadas são chamadas hormônios que atuam em tecidos alvos ligando-se a receptores específicos para realiza o de tarefas pré-determinadas. As glândulas que os secretam são chamadas glândulas endócrinas e seus produtos de secre o são veiculados pela corrente circulatória. Os hormônios secretados são responsáveis pelo crescimento, funcionamento e regula o de vários órgãos, mantendo assim o seu equilíbrio de funcionamento.

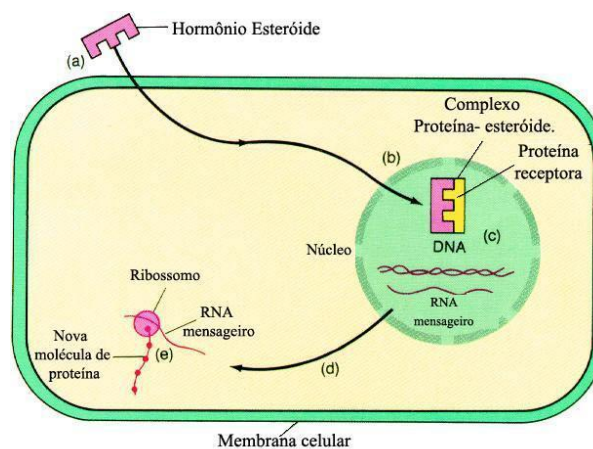
O sistema endócrino   constituído por: hipotálamo, hipófise ou glândula pituitária, glândula tireo ide, glândulas paratireo ides, glândulas supra-renais ou adrenais, glândula pineal, ilhotas de Langerhans (Pâncreas endócrino) e gônadas.

As glândulas endócrinas são reguladas pelo sistema nervoso, e em especial pelo hipotálamo ou por outras glândulas endócrinas, criando um complexo e sensível mecanismo de interrela oes neuroendócrinas.

A atividade desenvolvida pelo sistema endócrino é regulada por mecanismo de *feedback* ou retro-controle. O *feedback* é denominado "*feedback* negativo" quando a concentração do hormônio secretado por uma glândula alcança uma concentração acima do necessário levando a interrupção da secreção deste hormônio e interrompendo este circuito de ação. O *feedback* é denominado "*feedback* positivo" quando a concentração de um hormônio é baixa, necessitando que a glândula secrete-o para que uma determinada atividade fisiológica possa ser desenvolvida.

A ação hormonal ocorre devido à presença das moléculas receptoras (receptores) sempre "ancoradas" na membrana das células dos tecidos alvos. Os hormônios, em geral, induzem modificações na estrutura molecular quando se ligam aos seus receptores. Essas modificações permitem a interação do receptor com outros "mensageiros" localizados no interior da célula, desencadeando reações moleculares intracelulares para que a célula alvo exerça sua função. Em mamíferos o sistema nervoso e o sistema endócrino são interligados pelo hipotálamo, que regula a atividade da hipófise.

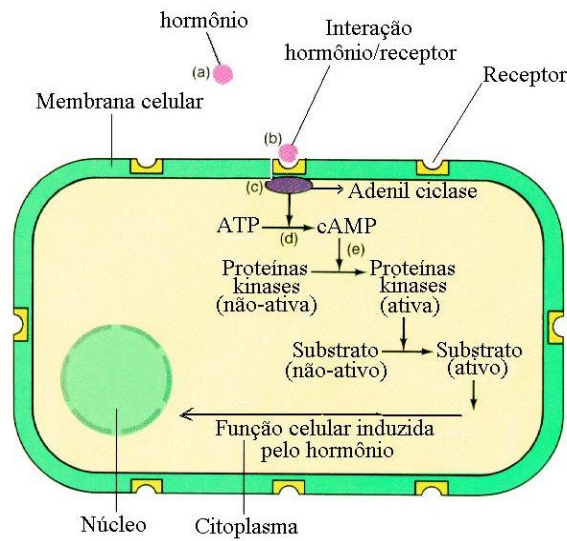
Figura 1: Ação dos Hormônios.



Fonte: Thiemann, 2012.

De acordo com a Figura 1 – (a) O hormônio esteróide passa através da membrana celular e (b) liga-se com a proteína receptora no núcleo.(c). Na Figura 2, o complexo proteína-esteróide ativa a síntese do RNA mensageiro.(d) o RNA Mensageiro deixa o núcleo para (e) sua função na produção de moléculas de proteínas.

Figura 2: Complexo proteína – esteroide.



Fonte: Thiemann, 2012.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS MAIS RELEVANTES

O comportamento dos IE no meio ambiente e seu destino final estão diretamente ligados com suas propriedades físico-químicas. Portanto para que possamos entender melhor os efeitos dessas substâncias, é necessário, primeiro entender as propriedades físico-químicas. Ghiselli e Jardim (2007) descrevem as propriedades mais relevantes, que serão usadas como ferramentas durante o estudo: solubilidade em água, coeficiente de partição, hidrofobicidade, biomagnificação, coeficiente de adsorção e toxicidade.

A solubilidade em água pode ser definida como a concentração máxima de uma substância dissolvida na água. Em águas superficiais, a solubilidade é totalmente dependente da temperatura, pH, sais dissolvidos, e também da existência de substâncias húmicas ou materiais suspensos (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Partição é a distribuição de uma substância química entre duas fases, seja ela abiótica, como água, sedimentos suspensos ou de fundo, ou biótica, como plantas e animais, que estão em equilíbrio ou estado estacionário (GHISELLI; JARDIM, 2007).

O grau de hidrofobicidade de uma substância é representado pelo coeficiente de partição octanol/água, conforme Equação 1:

$$K_{ow} = C_{\text{octanol}} \div C_{\text{água}} \quad (1)$$

Onde: Coctanol é a concentração da substância em n-octanol e Cágua é a concentração da substância em água.

O n-octanol é empregado uma vez que apresenta tanto características hidrofóbicas como hidrofílicas. A polaridade de uma substância química também está inversamente relacionada com sua hidrofobicidade. A ausência de grupos polares nas moléculas de uma substância altera a polaridade da mesma, diminuindo, conseqüentemente, sua solubilidade em água. Deste modo, pode-se dizer que tal substância apresenta elevada hidrofobicidade e elevada lipofilicidade. A massa molecular também tem relação com a hidrofobicidade de uma substância. Moléculas com alta massa molecular tendem a apresentar menor solubilidade em água (GHISELLI; JARDIM, 2007).

O fenômeno da biomagnificação resulta, essencialmente, de uma seqüência de etapas de bio-acumulação que ocorrem ao longo da cadeia alimentar. Bio-acumulação é um termo geral que descreve a tomada de um contaminante químico, do ambiente, por uma ou todas as rotas possíveis (respiração, dieta, via dérmica, etc.), a partir de qualquer fonte no ambiente onde tais substâncias estão presentes (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A sorção de substâncias químicas (contaminantes) está diretamente relacionada com o transporte e a mobilidade das mesmas no meio ambiente. Geralmente, moléculas que estão sorvidas apresentam menor mobilidade e, conseqüentemente, acabam não ficando disponíveis para participar de processos de transferência de fases (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A toxicidade é o efeito nocivo da substância nos seres vivos. A toxicidade é uma resposta biológica negativa pela presença de uma ou mais substâncias químicas (COSTA, 2009).

HISTÓRICO SOBRE INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Desde o final do século passado produtos da indústria química e farmacêutica destacam-se como micropoluentes emergentes no ambiente aquático, acarretando efeitos adversos ao meio ambiente aquático a saúde pública (KUMMERER, 2011 apud SOUZA, 2011). Com isso é possível identificar a presença de interferentes endócrinos, mas só agora com alguns estudos científicos foi comprovada a sua importância ambiental.

Essa problemática vem sendo apontada desde 1996 pelo Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

De acordo com estudos apontados os Interferentes Endócrinos (IE) são suspeitos por provocar doenças como câncer, o desenvolvimento sexual anormal, redução da fertilidade e demais doenças relacionadas.

Nos animais foram apontados problemas como alteração dos processos reprodutivos e o desenvolvimento gestacional, alteração de características sexuais femininas em peixes machos, podendo levar a esterilização ou redução das espécies (COLEMAN et al., 2005; HARRISON et al., 1997 apud FERREIRA, 2008).

Estudos relativos à hipótese de que substâncias químicas no ambiente podem estar relacionadas a efeitos estrogênicos vêm sendo relatados desde 1923 (ALLEN e DOISY, 1923; BURLINGTON e LINDEMAN, 1950, apud BAKER, 2001 apud FERREIRA, 2008). Entretanto, somente nos últimos 10 anos a preocupação de órgãos ambientais tornou-se mais evidente. Desenvolvendo assim vários trabalhos com o objetivo de avaliar os efeitos adversos dessas substâncias à saúde humana e à vida de animais.

No Quadro 1 é mostrada uma evolução cronológica de fatos e evidências relativos aos interferentes endócrinos.

Estudos da literatura mostraram a redução na atividade estrogênica de estrogênios como 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, utilizando alguns processos oxidativos. Ressaltando-se que a atividade estrogênica não foi completamente removida, mesmo com altas doses de ozônio aplicada, devido aos subprodutos formados (ROSENFELDT et al., 2007; HUBER et al., 2004; KIM et al., 2004; ALUM et al., 2004 apud FERREIRA, 2008).

Rosenfeldt et al. (2007 apud FERREIRA, 2008) verificaram que, utilizando o teste YES, 90 % da atividade estrogênica de 17β -estradiol e de 17α -etinilestradiol foi removida quando utilizaram o processo combinado H_2O_2 /UV.

Huber et al. (2004 apud FERREIRA, 2008) observaram que dosagens de ozônio tipicamente utilizadas em desinfecção de água potável foram suficientes para reduzir a estrogenicidade de 17α -etinilestradiol em mais de 200 vezes em pH 8. Entretanto, foi removido completamente a atividade estrogênica do composto 17α -etinilestradiol.

Kim et al. (2004 apud FERREIRA, 2008) verificaram que, com a ozonização de 17β -estradiol, a estrogenicidade não foi removida significativamente com o aumento da dosagem de ozônio (em pH 6,0). Concluíram que houve a formação de intermediários que apresentaram estrogenicidade similar a de 17β -estradiol, uma vez que essa substância foi rapidamente removida no início da ozonização.

QUADRO 1: Evolução cronológica de fatos e evidências relativos aos interferentes endócrinos.

Ano	Fato ou Evidência
1923	Detecta-se atividade estrogênica em extratos biológicos.
1950	Observa-se que o DDT apresenta atividade estrogênica.
1962	Surgem as primeiras correlações entre pesticidas e problemas na saúde de animais.
1963	Verifica-se que a exposição a hormônios naturais é perigosa e conduz ao câncer.
1968	Descobre-se que o DDT apresenta atividade estrogênica nos mamíferos e aves.
1971	Verifica-se que o dietil etil-bestrol (DES) leva ao câncer vaginal, sobretudo em mulheres cujas mães estiveram expostas a este produto durante a gravidez.
1972	DDT é proibido na agricultura.
1976	Verifica-se que o DDE está relacionado a problemas na reprodução humana.
1977	A produção e aplicação de bifenilas policloradas são restringidas.
1980	A utilização de certos hormônios sintéticos é restringida.
1993	Detecta-se relação entre xenoestrogênios e problemas no aparelho reprodutor masculino e feminino.
1996	Verifica-se que combinações de diversos xenoestrogênios apresentam sinergismos em diversos tipos de levedura.
1998	São formados os primeiros grupos de investigação a nível mundial para estudar esse problema.
1999	Desenvolvem-se estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para avaliar o potencial estrogênico de substâncias.

Fonte: Nogueira, 2003 apud FERREIRA, 2008.

Kim et al. (2004 apud FERREIRA, 2008) verificaram que, com a ozonização de 17 β -estradiol, a estrogenicidade não foi removida significativamente com o aumento da dosagem de ozônio (em pH 6,0). Concluíram que houve a formação de intermediários que apresentaram estrogenicidade similar a de 17 β -estradiol, uma vez que essa substância foi rapidamente removida no início da ozonização.

Alum et al. (2004 apud FERREIRA, 2008) verificaram que, apesar da remoção de 99% dos estrogênios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, a atividade estrogênica não foi completamente removida em pH 7,5, devido aos subprodutos formados durante a ozonização.

Investigações realizadas na Áustria, Brasil, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha, Suíça, Holanda e os EUA foram detectados no ambiente aquático mais de 80 compostos entre medicamentos e metabólitos de drogas diversas, sendo oriundos de compostos farmacologicamente ativos (PhACs), reconhecidos como uma das questões

emergentes mais importantes na química ambiental (HEBERER, 2002 apud FERREIRA, 2008).

De acordo com Leite, Afonso et al. (2010 apud SODRÉ et al, 2007), estudos de monitoramento de micropoluentes emergentes no Brasil em esgotos, águas superficiais e de abastecimento, ainda são incipientes, e a revisão da literatura mostra que há pouquíssimos trabalhos nacionais publicados abordando a presença de tais contaminantes em matrizes ambientais.

COMPOSTOS CLASSIFICADOS COMO INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Existe uma diversidade de compostos que podem ser considerados como IE, uma vez que sejam suspeitos de interferir no funcionamento do sistema endócrino (SOUZA, 2011). A seguir serão apresentadas as principais classes de IE.

Plastificantes

Segundo Sodré et al., (2007), os plastificantes são substâncias que são empregadas em materiais para aumentar a resistência e flexibilidade destes. Os principais plastificantes são os ftalatos e o bisfenol A.

Ftalatos e bisfenol A

Os Ftalatos são os plastificantes mais utilizados no meio industrial, são encontrados em todo ecossistema, águas superficiais e subterrâneas. São interferentes endócrinos de grande preocupação ambiental devido sua utilização na fabricação do policloreto de vinila (PVC) (PHAM; TYAGI et al., 2011, apud SOUZA, 2011).

O Bisfenol A é um plastificante utilizado como endurecedor de uma grande quantidade de materiais. É um composto usado em plásticos policarbonatos e epóxi de resina, presentes em resinas do forro da lata de alumínio e bebidas (ALVES et al., 2007). Este composto apresenta solubilidade em água elevada e coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$ 3,4) o que significa que a substância é adsorvida na matéria orgânica. Por ser bastante empregado nos processos industriais e formulações de produtos de uso doméstico são

encontrados em efluentes industriais, esgotos domésticos e também lodos de estações de tratamento de esgoto (ETE).

Bifenilas policloradas

As bifenilas policloradas (BPC), de acordo com Ghiselli e Jardim (2007), são compostos sintéticos clorados, utilizadas em diversos processos industriais. BPC possuem alta resistência elétrica, e são instáveis a temperatura e pressão elevada, por este motivo é utilizada em fluído dielétrico, isolante em capacitores e transformadores, fluído hidráulico, dentre outros. Essas substâncias são encontradas principalmente adsorvidas nos sedimentos e/ou materiais particulados, devido à elevada hidrofobicidade, seu potencial de bioacumulação e biomagnificação. Em relação a sua toxicidade as BPC são bastante impactantes para saúde humana e animal. No sistema endócrino podem exibir efeitos antagonistas e agonistas. Porém a principal exposição de BPC para os seres humanos está nos alimentos, principalmente em peixes e derivados, e animais com muita gordura.

Retardantes de Chama Bromada

São substâncias químicas presentes em vários tipos de materiais com o intuito de reduzir o risco de incêndio. Os compostos bromados mais utilizados são os éteres difenílicos polibromados, hexabromociclododecano e tetrabromobisfenol A (SODRÉ et al., 2007).

Pesticidas

São substâncias ou misturas químicas utilizadas para eliminar ou controlar organismos indesejáveis. Este é o grupo mais abrangente considerando a presença de IE (SODRÉ et al., 2007).

A maioria dos pesticidas são persistentes no meio ambiente, devido a sua estabilidade química, baixa solubilidade em água e muito bioacumulativo. Há muito interesse em relação à essas substâncias devido a alta toxicidade, sendo considerado uma das maiores fontes de dioxina para o meio ambiente (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Estrogênios Naturais e Sintéticos

Para Ghiselli e Jardim (2007), estrogênio, testosterona e progesterona são hormônios naturais presente nos animais e nos seres humanos. Há também os fitoestrogênios que são substâncias presentes nas plantas, como nas sementes de soja, que quando ingeridas por seres humanos podem agir de forma similar dos esteroides naturais.

Esteróides sexuais

Os estrogênios são a classe de esteroides mais conhecidas que são responsáveis pelas características secundárias femininas relacionadas ao crescimento, ao desenvolvimento e ao metabolismo. Os Estrogênios mais conhecidos são 17β -estradiol, estrona e estriol (SODRÉ et al., 2007). Muitos fármacos (medicamentos) possuem em suas fórmulas esteroides produzidos artificialmente, estes são utilizados principalmente para medicamentos contraceptivos e de reposição hormonal (SONNENSCHNEIN; SOTO, 1998, apud SODRÉ et al., 2007).

Os estrogênios naturais e sintéticos são excretados principalmente pela urina e em menor proporção pelas fezes. A concentração da excreção depende da idade do indivíduo, do estado de saúde, da dieta ou gravidez (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Fitoestrogênios

Conforme dito anteriormente, são substâncias encontradas em plantas, que nos seres vivos podem agir como determinados hormônios. São substâncias não esteroidais e suas concentrações variam de acordo com a planta em questão. Os fitoestrogênios são facilmente metabolizados e excretados pelo ser humano por meio da urina e da bÍlis, na forma de glucoronídios e sulfados conjugados, portanto a inclusão destas substâncias na dieta dos seres humanos traz mais efeitos benéficos à saúde do que maléficis (GHISELLI; JARDIM, 2007).

FONTES DOS IE NO AMBIENTE E SEU COMPORTAMENTO

São várias as atividade que subsidiam os IE no ambiente, as diversas atividades desenvolvidas pelo homem também podem causar contaminação dessas substâncias. Os IE assim como outros componentes químicos que têm potencial de contaminantes podem surgir no ambiente por meio de fontes pontuais ou difusas (SODRÉ, et al., 2007).

As fontes pontuais são mais fáceis de ser identificadas por serem bem caracterizadas, trata-se de descargas diretas no copo d'água, como por exemplo, descarga de efluente de estações de tratamento de efluentes industriais ou de esgoto, derramamentos acidentais, enchentes, dentre outras. Já as fontes difusas são aquelas que possuem difícil caracterização de sua origem, pois trata de rotas que resultam em deposições parciais de poluentes antes de chegarem aos corpos d'água, como por exemplo, deposições atmosféricas, derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes, lixiviação de compostos no solo, drenagem de águas pluviais em ambientes rurais e urbanos etc. (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A forma mais comum da dissipação de IE é a partir dos efluentes domésticos descartados em águas superficiais. É possível perceber que a presença de IE no ambiente está diretamente relacionada com a falta de eficiência nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) (SODRÉ et al, 2007).

OS INTERFERENTES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS

A alteração no sistema endócrino ocorre quando o interferente endócrino se liga aos receptores hormonais, modificando a sua resposta natural. Dois processos distintos podem ser desencadeados. A substância química pode se ligar ao receptor hormonal e produzir uma resposta, atuando então como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio; ou a substância química pode se ligar ao receptor sem produzir uma resposta, agindo como um bloqueador, ou seja, a substância impedirá a interação entre um hormônio natural e seu respectivo receptor (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Muitos interferentes endócrinos competem com o estradiol (hormônio sexual feminino produzido pelo organismo) pelos receptores de estrogênio. Outros competem com a diidrotestosterona (hormônio sexual masculino produzido pelo organismo) pelos receptores de androgênio. Portanto, estas substâncias exercem efeitos de feminização ou masculinização sobre o sistema endócrino. O bisfenol A, pode apresentar atividade anti-androgênica, ou seja, esta substância, quando em contato com os receptores hormonais do sistema endócrino, bloqueia os hormônios masculinos (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Conforme cita Sodré et al., (2007), muitos trabalhos têm sido realizados de forma a comprovar os efeitos causados pela exposição aos IE frente à biota, principalmente aquática, uma vez que grande parte destes compostos tem como destino final os sistemas de águas naturais. Um dos exemplos mais conhecidos no meio científico é o episódio envolvendo a

contaminação de crocodilos no lago Apopka (Flórida/EUA), na década de 1990. Na ocasião, alguns pesquisadores notaram que a população desses animais estava diminuindo ano a ano.

Estudos subsequentes demonstraram que a exposição contínua de alguns pesticidas, mesmo em concentrações baixas, sobre os ovos da espécie interferiu no desenvolvimento do sistema reprodutor dos animais, tornando-os inférteis (SUMPTER; JOHNSON, 2005 apud SODRÉ et al., 2007).

Estudos realizados por Harries et al., (1997 apud FERREIRA, 2008) mostraram que, em trutas que foram mantidas em gaiolas perto de descargas de uma estação de tratamento de efluentes, observou-se aumento do nível de vitelogenina, feminização de machos e presença simultânea de gônadas masculinas e femininas (hermafrodita). Além da feminização de peixes em pontos de descarte de efluentes de estações de tratamento de esgoto, observou-se também o aumento na incidência de tumores e doenças em espécies de peixes em áreas urbanas dos EUA e a formação disforme de ovas e larvas no Mar do Norte, na Europa. Considera-se que todos esses efeitos foram causados pela presença de IE. Uma vez que alguns destes compostos podem ser bioacumulados e biomagnificados dentro da cadeia trófica, animais superiores e não aquáticos também podem estar expostos aos IE. Prova disso é a ocorrência de distúrbios no sistema reprodutor de ursos polares devido à exposição alimentar a uma série de IE (GOKSOYR, 2006 apud SODRÉ et al., 2007).

No caso dos seres humanos Sodré et al., (2007) cita que, a fase embrionária   muito mais suscetível   a o dos IE em compara o ao indivíduo adulto. Por exemplo, Swan e colaboradores (2007 apud SODRÉ et al., 2007) evidenciaram que os hormônios utilizados como promotores do crescimento do gado assim como os pesticidas utilizados para a melhoria da pastagem foram responsáveis pela redu o da taxa de espermatozoides em homens gerados por mulheres que ingeriram muita carne vermelha durante a gesta o.

Muitos estudos têm revelado que, nos últimos 60 anos, a contagem média de espermatozoides em alguns países diminuiu pela metade e dobrou a incidência de 33 malforma es do sistema reprodutivo masculino. A exposi o de homens adultos a substâncias estrog nicas pode resultar em crescimento das mamas e interferência no funcionamento do sistema glandular associado ao hipotálamo, hipófise e gônadas, resultando em diminui o da libido, impotência, diminui o dos níveis de androg nios no sangue e diminui o na contagem de espermatozoides (WARING e HARRIS, 2005 apud FERREIRA, 2008).

Algumas doenças como câncer de útero, de mama e de próstata, redu o de fertilidade masculina, desenvolvimento sexual anormal, altera o de glândulas tireoides, aumento de

incidência de ovários policísticos, distúrbios nas funções do ovário, na fertilização e gravidez, endometriose e efeitos neurocomportamentais podem, possivelmente, ter seu desenvolvimento induzido por interferentes endócrinos. (COLEMAN et al., 2005; SOLOMON e SCHETTLER, 2000; GRAY JR., 1998; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997; DASTON et al., 1997 apud FERREIRA 2008).

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Extração líquido-líquido

De acordo com Souza (2011), a extração líquido-líquido (ELL) é um método utilizado para a extração de micropoluentes emergentes. Esse processo envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis ou pouco miscíveis. Na ELL ocorre o contato da solução com um solvente fazendo com que duas fases em equilíbrio se separem.

A grande vantagem da ELL se deve ao fato de sua simplicidade, baixo custo e possibilidade de uso de vários solventes. Porém, as principais desvantagens se devem a necessidade do descarte de solventes, a perda do analito se a amostra tiver alta afinidade com a amostra e impurezas do solvente na amostra (QUEIROZ; COLLINS et al., 2001, apud SOUZA, 2011).

Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) é um método utilizado para separação líquido-sólido. Esta é uma técnica seletiva de preparação da amostra para reduzir o nível de interferentes, minimizar o volume final da amostra e fornecer a fração de analito em solventes compatível com as peculiaridades da técnica instrumental a vir ser empregada (SOUZA, 2011).

Para Queiroz, Collins et al.,(2001, apud SOUZA, 2011) a técnica se divide em 5 etapas: ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; condicionamento do sorvente com solvente adequado; introdução da amostra e retenção do analito; limpeza da coluna para retirar os interferentes; e eluição e coleta do analito.

A EFS é uma técnica vantajosa quando comparada com o método líquido-líquido, considerando a economia de tempo e solventes. Porém também apresenta algumas desvantagens como a variação de qualidades de adsorventes e necessidade de equipamentos especiais.

MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Segundo Liu; Zhou et al., (2004, apud SOUZA, 2011) para a determinação de IE em amostras aquosas ambientais, como esgotos sanitários, industriais, corpos receptores ou mesmo em água de abastecimento, evolve três etapas: amostragem, pré-concentração da amostra e determinação analítica. Por conta da baixa quantidade destes poluentes é de extrema importância para se obter bons resultados os aspectos como amostragem, o transporte das amostras e sua estocagem e também os equipamentos utilizados.

Quando o objetivo é identificar e quantificar compostos específicos, a análise química é mais apropriada. Dentre das análises químicas existem a cromatografia líquida e gasosa, associadas à espectrometria de massas (FERREIRA, 2008).

Ainda de acordo com Ferreira (2008) existem também avaliações *in vitro* e *in vivo* que servem para avaliar apenas um composto ou uma mistura de compostos que possuem uma atividade de IE. Comumente utilizados para determinar o potencial estrogênico de um efluente descartado no meio ambiente ou de uma amostra de água superficial.

Uma das análises importantes que vem sendo estudada pela CETESB junto à secretaria do meio ambiente do governo paulista no Brasil é a utilização de leveduras transgênicas luminescentes que quando entra em contato com IE promove um brilho que é detectado por um luminômetro para determinar a medida de luminosidade das leveduras. (BERGAMASCO et al, 2011; MONTAGNER; JARDIM, 2011 apud VASCONCELOS, 2012).

Conforme Reis Filho et al. (2006, apud FERREIRA, 2008) a determinação de hormônios no meio ambiente é bastante difícil devido a complexidade das matrizes ambientais e a sua baixa concentração, mas mesmo assim fisiologicamente ativa. Por isso a utilização de análises químicas permite a determinação desses compostos estrogênicos no meio ambiente.

INTERFERENTES ENDÓCRINOS E SEUS TRATAMENTOS

De acordo com Sodré et al., (2007, p. 15) os IE encontrados no meio ambiente após tratamento de efluentes e esgotos, estão relacionados com os processos utilizados nas estações de tratamento e as características específicas de cada composto.

Quando $\log K_{ow} < 4$ o composto é solúvel em água sendo que a maioria dos compostos possui grande solubilidade em água, elucidando-se a dificuldade de remoção desses compostos por métodos convencionais de tratamento.

Segundo Sodré et al., (2007, p. 17) a baixa remoção de muitos IE se dá por conta de suas características físicas e químicas, os compostos que são bastante solúveis em água permanecem no efluente final, considerando processos convencionais de tratamento.

Muitos dos tratamentos utilizados que são mais comuns, não possuem uma boa eficiência de remoção para todos compostos e conseqüentemente são lançados no meio ambiente, isto gerou uma preocupação e desenvolvimento de métodos que possam atender a necessidade de remoção dos IE pois cada composto possui uma solubilidade diferente do outro por isso existem vários métodos específicos para os IE.

Segundo Camel e Bermond (1998, FERREIRA, 2008) algumas técnicas bastante promissoras para remoção de IE são: ozônio molecular e radicais OH, como utilizam fortes agentes oxidativos são mais eficazes na remoção de micropoluentes.

Para von Guten. (2003, apud FERREIRA, 2008) a estabilidade do ozônio é dependente de vários fatores e o pH é que merece uma atenção especial pois o principal produto de decomposição do ozônio é o radical hidroxila, sendo que o ozônio é instável em água.

A interação do ozônio com uma substância química pode ocorrer de forma direta ou indireta, quando ocorre a oxidação direta de substâncias orgânicas pelo ozônio, é uma reação seletiva, já de forma indireta ocorre porque a reação envolve a geração de OH sendo assim uma reação não seletiva (GOTTSCHALK et al, 2002 apud FERREIRA, 2008).

O ozônio pode se decompor de forma acelerada quando há um aumento de pH, adição de peróxido de hidrogênio ou luz UV, segundo Almeida et al; von Guten. (2004, 2003, apud FERREIRA, 2008). Por conta disto, segundo Ferreira (2008) a oxidação de substâncias orgânicas pode ocorrer de duas maneiras, direta, predominante em meio ácido via ozônio molecular ou indireta, predominante em meio básico como radical hidroxila.

VALORES DE REFERÊNCIA

Um estudo realizado por um grupo holandês identificou que é possível traçar valores de referência para compostos com atividade endócrina em amostras de água utilizando bioensaios *in vitro* CALUX.

Os bioensaios *in vitro* são agora reconhecidos como ferramentas de monitoramento sensível para detecção de contaminantes com base em sua ação biológica. Como a composição química específica de uma amostra é muitas vezes desconhecida, e métodos químicos não podem detectar efeitos de mistura, bioensaios *in vitro* são ferramentas altamente adequadas para examinar a presença de complexas misturas em concentrações baixas (ESCHER; LEUSCH, 2011; LEUSCH et al., 2010;. VAN DER LINDEN et al., 2008 apud BRAND et al., 2013).

Segundo Brand et al. (2013), uma série de bioensaios *in vitro* tem sido desenvolvida para estrogenicidade, incluindo reportagem baseada em células de mamíferos, leveduras, ensaios de gene, ou ensaios de proliferação de células que respondem a estrogénios. O bioensaio ER α CALUX tem boa sensibilidade e reprodutibilidade e, recentemente, outros bioensaios *in vitro* CALUX para a detecção de atividade endócrina tem sido desenvolvidos, capazes de detectar a atividade androgênica, glicocorticóides ou progestogênicas. Esses últimos bioensaios CALUX consistem de células de osteossarcoma humano U2OS (câncer de osso), que são transfectadas com um gene de luciferase sob o controle de um receptor específico da glândula endócrina, tais como os receptores de estrogénio (ER α), androgénio (AR), glicocorticóides (GR) e de progesterona (PR) (HOUTMAN et al., 2009;. LEUSCH et al., 2010, 2012; SONNEVELD et al., 2005 apud BRAND et al., 2013).

Utilizando bioensaios *in vitro*, as atividades biológicas combinadas da mistura podem ser quantificadas e expressas como ng eq de um composto de referência por L. Isso permite que os compostos desconhecidos sejam detectados por sua atividade e fornece relevância toxicológica (ou seja, atividade endócrina específica) desta mistura. Juntamente com a sensibilidade e robustez, essas propriedades fazem o uso de bioensaios *in vitro*, como a bateria de bioensaios CALUX, muito adequado como ferramenta de detecção de atividade endócrina em amostras de água (ESCHER; LEUSCH, 2011; apud BRAND et al., 2013).

A geração de dados por meio destes bioensaios *in vitro* requer o estabelecimento de limites máximos de concentração de atividades hormonais para água potável, pelos quais as respostas celulares das amostras de água podem ser julgadas. Os valores-limite para água potável devem ser suficientemente conservadores para servir como um sinal de aviso. Porém,

não devem ser tão conservadores, para evitar medidas de proteção desnecessárias e dispendiosas (BRAND et al., 2013).

TEORIA DO CÁLCULO

Para compensar as diferenças de absorção e metabolismo de primeira passagem, o valor de IDA (ingestão diária aceitável) específico (ng / kg de peso corporal / dia) é multiplicado pela fração biodisponível via oral estimada do composto de referência. Posteriormente, o resultado é multiplicado pela fração não ligada a proteínas do plasma (f_{up}) produzindo a concentração interna e disponível do composto de referência que não induz efeitos adversos para o corpo.

Na próxima etapa, a concentração do composto de referência interno e disponível é dividida pelo valor máximo assumido da fração biodisponível via oral e pelo máximo valor de f_{up} estimado para outros compostos com a mesma atividade endócrina, que potencialmente poderia estar presente em amostras de água (BRAND et al., 2013).

A maior biodisponibilidade oral e valores de fração não ligada à proteína de compostos relevantes foram usados para estimar o equivalente a dose externa segura que não provoca efeitos (ng de IDA do composto de referência - eq/kg peso corporal / dia). Ao multiplicar a dose externa equivalente por 60 kg de peso corporal como um padrão, média de peso corporal, e dividindo-o por um padrão de consumo médio de água de 2 L / dia e aplicando o padrão de fator de alocação de 20% definido para a água potável, um valor de referência em equivalentes de uma atividade hormonal específica (composto de referência ng eq / L) é obtido. (WHO, 2011; OMS, 2011 apud BRAND et al., 2013).

VALORES DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (IDA)

O *Joint Expert Committee on Food Activity* (JECFA) obteve um valor de IDA de 50 ng / kg de peso corporal / dia para E2 (17 β –estradiol), porque é utilizado como regulador de cio em gado e conseqüentemente pode estar presente em alimentos. Este valor foi baseado em alterações hormono-dependentes da indução de E2 em 23 mulheres pós-menopausa, que têm baixa produção de endógeno E2. Tais alterações não ocorreram a um nível de dose de 0,3 mg / dia de E2 (equivalente a um NOEL – nível de efeito não observado - de 5 μ g / kg de peso corporal/ dia), o que não aliviou os sintomas da menopausa (OMS, 2000 apud BRAND et al., 2013). O valor obtido de 50 ng / kg de peso corporal / dia para E2 foi escolhido como o ponto

de partida para o valor de referência para atividade estrogênica, já que E2 é considerado um dos dois estrógenos ambientais dominantes, juntamente com EE2 (17 α -Ethinylestradiol) (SNYDER et al., 2001 apud BRAND et al., 2013).

Vários compostos podem contribuir para a atividade androgênica em amostras ambientais, incluindo a DHT (Dihidrotestosterona) e T (testosterona). Para o composto de referência AR (receptor de androgênio), DHT não foi relatado valor de IDA, no entanto, para o T foi obtido um valor de IDA de 2 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia (FAO / WHO, 2000 apud BRAND et al., 2013).

No Canadá, Estados Unidos e Austrália, o uso de testosterona como regulador de crescimento bovino é permitido, e como resultado, pode estar presente em alimentos. Em um estudo envolvendo cinco pacientes do sexo masculino com eunuoidismo, resultando em níveis muito baixos de testosterona e funcionamento sexual comprometido, uma dose oral de 100 mg de T / dia não teve qualquer efeito sobre o funcionamento sexual, enquanto uma dose oral de 400 mg de T / dia foi eficaz no restabelecimento da função sexual por completo (JOHNSEN et al., 1974 apud BRAND et al. 2013). Portanto, uma dose oral de 100 mg de t / dia (Equivalente a 1,7 mg / kg de peso corporal / dia) foi usado como NOEL - nível de efeito não observado - no cálculo da IDA, de 2 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia, o qual foi utilizado como ponto de partida para determinação do valor de referência para a atividade androgênica (BRAND et al., 2013).

Segundo a organização mundial de saúde, vários glicocorticóides naturais e sintéticos têm sido detectados em amostras de água do ambiente, incluindo o composto de referência GR (receptor de glicocorticóides), o DEX (dexametasona). Para o DEX o JECFA obteve um valor de IDA de 15 ng / kg de peso corporal / dia, porque esta substância, dependendo da dose, aumenta a atividade da tirosina amino-transferase no sobrenadante de homogenatos de fígado de rato. Este valor de IDA foi usado como ponto de partida para determinar o valor de referência para a atividade glicocorticóide. (BRAND et al., 2013).

O P4 (progesterona) natural, e a noretisterona e levonorgestrel sintéticos estão entre os compostos progestogênicos mais relevantes em amostras ambientais (BESSE; GARRIC, 2009; TOLGYESI et al., 2010 apud BRAND et al., 2013). Para P4, o JECFA definiu um valor de IDA de 30 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia, porque uma única dose oral de 200 mg de partículas finas de progesterona (equivalente a 3,3 mg / kg de peso corporal) para mulheres fornece concentrações sanguíneas similares a aquelas encontradas durante a fase lútea do ciclo ovulatório (OMS, 2000 apud BRAND et al., 2013). Esta dose foi considerada a LOEL – nível de mais baixo efeito observado - e utilizada no cálculo da IDA para a progesterona, o

qual foi utilizado como um ponto de partida para a definição do valor de referência para a atividade progestogênica (BRAND et al., 2013).

Como exemplo, o cálculo do valor de referência para atividade estrogênica é mostrado na Equação 2, segundo Brand et al., 2013.

$$\text{Valor de referência} = 1000 \times \frac{BW \times Af \times RP \times ADI_{E2} \times fa_{E2} \times fu_{PE2}}{V \times fa_x \times fu_{Px}} \times ng \ E2 - eq/L \quad (2)$$

Em que:

BW = padrão adulto de peso corporal (60 kg)

Af = fator padrão de distribuição de água potável (0,2)

V = consumo diário de água potável adulto padrão (2 L / d)

ADI_{E2} = IDA de E2 (0,050 μg / kg de peso corporal / d)

fa_{E2} = fração absorvida do E2 (0,05)

fu_{PE2} = fração não ligada à proteína de E2 (0,02)

fa_x = fração absorvida substância estrogênica desconhecida em amostras de água (0,5)

fu_{Px} = fração não ligada à proteína por substância estrogênica desconhecida em amostras de água (0,16)

RP = potência relativa do valor de IDA da substância de referência em comparação a substância de referência do bioensaio CALUX (para E2 isto é igual a 1).

TESTES COM LEVEDURAS REALIZADOS PELA CETESB

A CETESB está realizando estudos com leveduras luminescentes para detectar o hormônio estrogênio na água.

Este processo funciona da seguinte forma: as leveduras transgênicas contêm genes receptores de estrogênio humano e um gene de uma bactéria luminescente que a faz brilhar, a levedura é introduzida na água para testes, o gene receptor humano faz com que a levedura “cole” no estrogênio que estiver presente na água e acaba-se detectando a contaminação.

Sendo que para ser detectado é necessária a utilização de um luminômetro que medirá a luminosidade das leveduras.

Este é um dos estudos pioneiros realizados pela CETESB, para detecção de hormônios em rios que estão na área de mananciais, segundo a CETESB, por mais que sejam utilizados esses tipos de métodos de ponto é necessário que a legislação seja mudada, para que este tipo de contaminações seja detectado com maior antecedência.

RESULTADOS

De acordo com Brand et al. (2013), usando a Equação 2, um valor de referência para a atividade estrogênica de 3,8 ng E2-eq / L foi calculado. Os valores de referência para as demais atividades hormonais foram obtidos de um modo semelhante, e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de referência para atividades hormonais.

	IDA/ (µg/kg peso corporal/dia)	IDTI referente	Dose externa equivalente	Valor de referência
Era	0.050	(E2 - 17β-estradiol)	0.625 ng E2-eq/kg peso corporal/dia	3.8 ng E2-eq/L
AR	2	(T - Testosterona)	12.17 ng T-eq/kg peso corporal/dia = 1.826 ng DHT-eq/kg peso corporal/dia	11 ng DHT-eq/L
GR	0.015	(DEX Dexametasona)	- 3.450 ng DEX-eq/kg peso corporal/dia	21 ng DEX-eq/L
PR	30	(P4 - Progesterona)	750 ng P4-eq/kg peso corporal/dia = 55.5 ng Org2058-eq/kg peso corporal/dia	333 ng Org2058-eq/L

Fonte: Brand et al., 2013.

LEGISLAÇÃO VIGENTE

Toda essa problemática deve ser estudada a fundo para melhorar a qualidade de vida das pessoas e deixar o meio ambiente mais equilibrado com o desenvolvimento sustentável.

Devido a grande quantidade de doenças que vem sendo descoberta essa preocupação com a saúde pública esta cada vez mais crescente e as legislações são fundamentais para acompanhar no controle dos IE recebendo assim uma atenção maior, não só para controle, mas também para que haja melhorias nos tratamentos e diminuição dos produtos que possam gerar estas substâncias futuramente.

CONCLUSÃO

Estas substâncias são muito difíceis de serem removidas em tratamentos convencionais por serem muito solúveis e em grande variedade, com características químicas diferentes, exigindo assim um tratamento mais específico pra cada IE.

No Brasil o principal órgão ambiental que possui estudos detalhados e tecnologia para identificar os IEs é a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) que está ligada à Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, ela é pioneira nos estudos e levantamentos de dados, sendo que atualmente já existem estudos voltados para algumas áreas do estado de São Paulo que podem estar contaminadas alterando o meio ambiente.

Desde 1923, com a primeira identificação da atividade estrogênica nos estudos biológicos, a incerteza de suas causas incentivaram equipes de análises a serem criteriosos em rastrear substancias com a mesma capacidade ao longo dos anos. Esta rastreabilidade traz a estruturação de parâmetros de uso e descarte de substâncias deste perfil, gerando assim legislações e condicionantes competentes ao tratamento do efluente.

Ainda não há grandes avanços para inclusão de parâmetros no tratamento do efluente industrial para retirada desses compostos. O reflexo desta falta de tratamento pode causar impactos diretos na população, pois o consumo de IE por bioacumulação ou diretamente contidos na água de consumo.

Hoje ainda não é possível obter dados precisos sobre os impactos de causa direta do IE, mas profissionais de diversas áreas já procuram entender melhor o que está acontecendo com os animais em algumas partes do mundo. No Brasil a CETESB tem desenvolvido pesquisas para estudar as consequências, fontes e formas de extração do IE, com este trabalho será possível determinar os mínimos ou a necessidade de eliminação desses compostos para que a água de consumo humano não venha ser um vilão no dia a dia da população.

A demanda crescente por produtos e o avanço de tecnologias em relação á eficácia dos mesmos, fez com que novas substâncias químicas sejam criadas, porém a criação de muitas delas não levou em conta seu efeito no meio ambiente, seres vivos e no contato com outras substâncias que possam potencializar seus efeitos.

São ameaças silenciosas e estão presentes na água, assim esses componentes que entram em contato com o sistema endócrino dos seres vivos estão associados a diversas

doenças como câncer, queda de taxa de espermatozoides, feminização e masculinização, malformações nos órgãos do sistema reprodutor e até infertilidade.

Em países como Suíça, Holanda, Alemanha e na Europa em geral os estudos sobre os IE já são feitos há mais de 20 anos, mas apenas para levantamento analíticos e dados comprobatórios, há pouco mais de 10 anos é que estas pesquisas vêm sendo levadas com mais seriedade, onde o principal foco é a determinação de suas fontes e os impactos na biota como um todo, sendo que os principais interferentes são pesticidas e hormônios em geral.

Através deste estudo foi possível identificar que, substâncias quimicamente conhecidas, estão trazendo como consequências alterações nos sistema endócrino dos seres humanos ao longo dos anos, sem que haja uma metodologia definida para extração de tais substâncias da água de consumo humano.

Devido a grande versatilidade das propriedades físico-químicas desses IEs é muito difícil de identificar a substância química que está agindo como IE, mas através de um impacto ambiental causado por este IE, sua origem como efluentes despejados em um corpo d'água e seus efeitos causados na biota, em geral, é possível desenvolver barreiras que inibirão sua ação, como por exemplo, novos métodos de tratamento de efluentes com metodologias mais específicas, um maior estreitamento da legislação, punição aos agentes causadores e a criação urgente de uma legislação específica aos IEs.

A presença de IE em águas superficiais e de abastecimento para consumo humano é um grande problema principalmente aqui no Brasil, pois a tecnologia em saneamento básico existente (métodos convencionais) não é suficiente para eliminar a presença destes nas águas uma vez que apresentam grande solubilidade.

Sua importância é acrescida por conta do grande problema em relação a não possuir limites de contaminação, pois por serem muito solúveis em água atingem qualquer local ou região, podendo gerar até mesmo problemas com países vizinhos, caso seja proibido um tipo de substância em um país e no outro não.

Ao longo dos nossos levantamentos técnicos observou-se que atualmente no Brasil não existe uma legislação vigente específica para os IEs, existem apenas valores padrões e valores de gatilho que apontam a contaminação de uma área pelos IEs.

Pouco ainda se sabe sobre a ação dos IE, e quais são os compostos que possuem essa capacidade mesmo porque muitas dessas substâncias acabam se misturando e complica ainda mais o seu diagnóstico no meio ambiente podendo potencializar seus efeitos nos seres humanos e animais. Também não há legislação que se aplique a estes componentes no Brasil. Portanto, é de extrema importância a pesquisa sobre o assunto, para a comprovação dos

efeitos sobre o sistema endócrino dos animais e dos seres humanos, bem como o estabelecimento de uma legislação mais específica e eficaz, pois este problema da vida moderna pode colocar a existência de muitas espécies em risco.

REFERÊNCIAS

ALVES, C; FLORES, L; CERQUEIRA, T; TORALLES, M. *Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças*. Rio de Janeiro, Maio de 2007.

BRAND, W; JONGH, C.M.; VAN DER LINDEN, S.C.; MENNES, W; PUIJKER, L.M.; VAN LEEUWEN, C.J.; VAN WEZEL, A.P.; SCHRIKS, M; HERINGA, M.B. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment International*, v. 55, p. 109 - 118, 2013.

COSTA, R. C. *Contaminação da água como causa de interferentes endócrinos*. 2009. Tese (Conclusão do Curso de Pós Graduação de Química Ambiental) - Escola Superior de Química. Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo.

FERREIRA, M. G. M. *Remoção da atividade estrogênica de 17 β -Estradiol e de 17 α -Ethinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂*. 2008. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GHISELLI, G., JARDIM, W. F. Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

SODRÉ F.; LOCATELLI M.; MONTAGNER C.; JARDIM W. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. *Caderno Temático*, Universidade Estadual de Campinas, v. 6, Abr 2007.

SOUZA, C. N. *Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais*, 2011. Tese Pós-Graduação em Engenharia Civil - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

THIEMANN, O. *Biologia II - Apostila 06 - Sistema Endócrino 2012* - Instituto de Física de São Carlos – USP. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte6.pdf>. Acessado em 20 de março de 2013.

VASCONCELOS, Y. Levedura Luminescente. *A Preservação da Terra*, n. 193, p. 69-71, Mar. 2012.