

Gil Ribeiro da Rocha Barros

Hormonas nas Águas e Perigos para a Saúde Pública

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Angelina Pena e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Gil Ribeiro da Rocha Barros, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas com o nº 2008011380, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada á Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, á exceção das minhas opiniões pessoais.

(Gil Ribeiro da Rocha Barros)

Coimbra, 11 de Julho 2014

Agradecimentos

O meu agradecimento especial à minha tutora e orientadora, a Professora Doutora Angelina Pena, que sempre me acompanhou ao longo da elaboração desta monografia dando-me importantes conselhos e correções essenciais. Sem ela nada deste trabalho seria possível. Muito obrigada.

O meu agradecimento mais que especial aos meus pais e a minha irmã que me apoiaram ao longo destes 6 anos, estando lá sempre nos bons e maus momentos. Sem eles nada disto seria possível. O meu sincero obrigada.

Aos meus amigos que, durante a vida académica, me incentivaram e me transmitiram um espírito de camaradagem que me fez sentir Coimbra como uma nova casa.

Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo\Abstract	3
1- Introdução.....	5
2- Hormonas.....	6
3- Consumo	8
4- Vias de Contaminação	8
5- Legislação.....	10
5.1- Legislação no domínio da política da água	10
5.2- Legislação do Medicamento	11
6- Estudos de ecotoxicidade	13
7- Metodologias analíticas para determinação das Hormonas	17
8- Como tratar as águas contaminadas?	20
9- Conclusão.....	22
10- Bibliografia.....	24

Abreviaturas

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

CG- Cromatografia Gasosa

DDA- Dose Diária Admissível

E2- Estradiol

EE2- Etillestradiol

EM- Espectrometria de Massa

EMA- Agência Europeia do Medicamento

ERA- Avaliação do Risco Ambiental

ETARs- Estações de Águas Residuais

EUA- Estados Unidos da América

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

mRNA- Ácido Ribonucleico mensageiro

NQA- Normas de Qualidade Ambiental

PEC- Previsão da concentração ambiental

PNEC- Previsão da concentração sem efeito observável

SPE- Extração em fase sólida

UE- União Europeia

WHO- Organização Mundial de Saúde

Resumo

A preocupação com o ambiente tem vindo a crescer de dia para dia, aumentando ainda mais quando se fala da poluição das águas.

As hormonas esteroides, considerados poluentes emergentes, foram encontradas em quantidades residuais em águas. Possuem efeito desregulador endócrino, e já foi observado em várias espécies aquáticas, efemização dos peixes e alterações nos tecidos sexuais, causados pela exposição crónica a estas substâncias.

A legislação no domínio da política da água, através da diretiva 2013/39 da EU, no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água, a fim de atender a esta preocupação, estabelece a avaliação e o controlo do risco dos medicamentos para o meio aquático, e inclui na primeira Lista de Vigilância duas hormonas.

Também a EMA estabeleceu *guidelines* para a Avaliação do Risco Ambiental do Medicamento, com o objetivo de minimizar o efeito dos medicamentos no ambiente. De forma a cumprir a legislação em vigor, são necessárias metodologias analíticas que consigam a sua quantificação a nível residual, sendo a HPLC acoplada à espectrometria de massa o método de eleição.

Outra área fundamental para minimizar a contaminação ambiental é o desenvolvimento de métodos de tratamento das águas residuais que melhorem a eficiência de remoção das hormonas esteroides.

Todas estas medidas tem como objetivo a proteção do meio aquático e da saúde humana.

Abstract

Concern with the environment has been growing from day to day, further increasing when speaking of water pollution.

The steroid hormones, considered emerging pollutants have been found in trace amounts in water. This compound have endocrine disruptor effect and has been observed in various aquatic species, feminization of fish and changes in sexual tissues, caused by chronic exposure to these substances.

Legislation in the field of water policy by 2013/39 UE, in respect of priority substances in the field of water policy in order to address this concern, establishes the assessment and risk control of medicinal products for the aquatic environment, and includes in the first Watch List two hormones.

EMA also established *guidelines* for the Environmental Risk Assessment of Medicines, with the goal of minimizing the effect of medicines on the environment.

In order to comply the legislation in force, analytical methodologies are able to quantify their residual level, with HPLC coupled to mass spectrometry being the method of election.

Another critical area to minimize environmental contamination is the development of methods for treatment of wastewater to improve the efficiency of removal of steroid hormones.

All these measures aimed to protect the aquatic environment and human health.

I- Introdução

O tema desta monografia surge com a crescente consciencialização dos problemas ambientais relativamente aos recursos hídricos ao nosso dispor. Este tema é atual, fundamental para o futuro e enquadra-se no ato farmacêutico uma vez que o farmacêutico é um agente de Saúde Pública. Possui qualificações científicas e técnicas necessárias para realizar o controlo de qualidade, verificar a legislação e atuar no tratamento das águas.

A água, recurso limitado e fundamental, base de toda a vida na terra é tanto mais importante quanto maior for o risco de desertificação ou de poluição. Devido a esta importância, nas últimas décadas têm vindo a ser investidos diversos recursos económicos e científicos para o estudo das águas e avaliação da sua qualidade.

Os poluentes emergentes nas águas são definidos como compostos que não estão abrangidos pela legislação em vigor no que diz respeito à qualidade da água e cujo risco ambiental ainda não está suficientemente estudado. Estes incluem uma grande variedade de produtos, desde plastificantes, detergentes, perfumes, produtos de higiene pessoal e medicamentos, entre outros (1).

Os medicamentos são poluentes emergentes com características particulares, uma vez que são substâncias biologicamente ativas e desenhados para serem persistentes. Certos fármacos, apesar da sua baixa lipossolubilidade são detetados nos tecidos dos peixes em concentrações superiores às presentes no ambiente aquático. Este efeito de bioacumulação resulta, em parte, do facto dos fármacos serem desenvolvidos para utilizarem a via do transporte ativo no acesso intracelular (2).

Esta monografia centra-se no grupo farmacoterapêutico das hormonas esteroides, que têm vindo a ser encontradas nas águas em concentrações residuais ($\mu\text{g/L}$ ou ng/L) e os seus efeitos nocivos já se encontram reportados na literatura científica (3).

Devido à toxicidade destes compostos existe uma preocupação crescente a nível mundial para a minimização do problema. Uma das ações implementadas foi promover nova legislação a nível da qualidade da água, através da diretiva 2013/39/UE da qual já fazem parte duas hormonas (17-beta-Estradiol e o 17-alfa etinilestradiol) (4), mas também em relação à avaliação do risco ambiental dos medicamentos por parte da Agência Europeia do Medicamento (EMA) (5).

Outro fator a ter em consideração é o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a remoção total destes compostos, nas Estações de Águas Residuais (ETARs) visto que estas hoje em dia ainda não estão preparadas para tal (6).

2- Hormonas

Os desreguladores endócrinos estão definidos, segundo a União Europeia (UE), como uma substância ou composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, na sua descendência, ou em (sub) populações (7). Entre estes compostos encontram-se os estrogénios naturais (estrona), os androgénios naturais (testosterona), os fitosteroides (17-beta-sitosterol), os isoflavonóides e os estrogénios sintéticos (8).

Este trabalho vai incidir nas hormonas esteroides, de origem natural ou de origem sintética que têm como base a mesma estrutura química, como se pode ver na figura I (8).

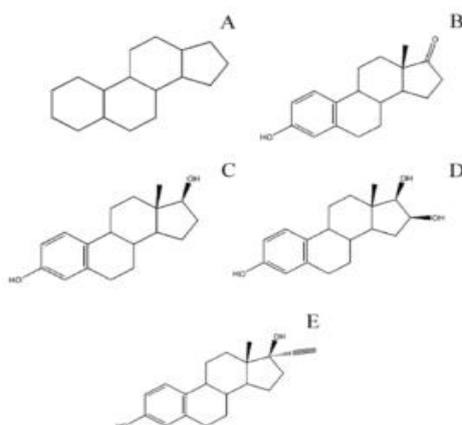


Figura I - (A) estrutura base; (B) Estrona; (C) Estradiol; (D) Estriol; (E) Etinilestradiol (8).

As mais importantes de origem natural são o estradiol (E2), a estrona e o estriol. Estas hormonas fazem parte do sistema endócrino e são produzidas em glândulas entre as quais córtex adrenal, os testículos e os ovários. As hormonas esteroides têm todas a mesma estrutura base, pois todas derivam do colesterol (9).

Estas hormonas têm como principal função o desenvolvimento e manutenção das características sexuais, tendo um papel fundamental para a diferenciação sexual e conseqüente propagação da espécie (9).

O seu mecanismo de ação consiste no lançamento direto na corrente sanguínea, depois de produzidas a partir do colesterol, onde se vão ligar a proteínas plasmáticas, que as transportam até à célula alvo. Aí penetram na célula e dirigem-se para o núcleo onde se ligam a recetores nucleares. Este complexo (hormona-recetor) liga-se por sua vez a partes específicas do ADN, interferindo com a transcrição do mRNA. Este mRNA, vai ser

traduzido dando origem a proteínas específicas, que vão transmitir a informação a outras células (ver figura 2) (9) (10).

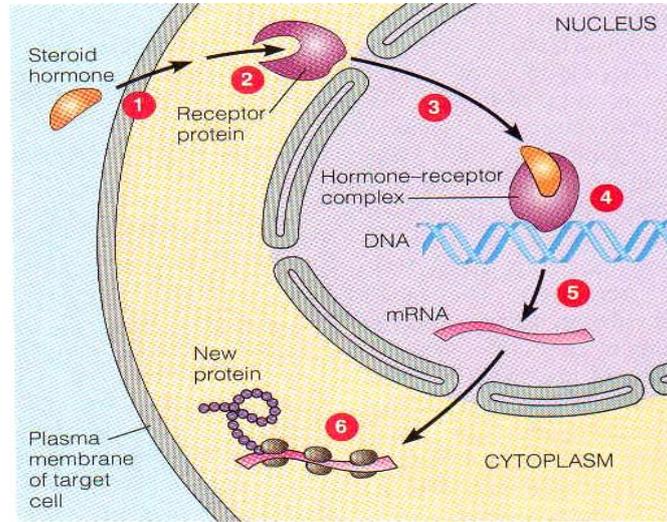


Figura 2- Esquemática do mecanismo de ação das hormonas esteroides (11).

As hormonas esteroides são eliminadas principalmente pela via renal. Mas, antes de serem excretadas sofrem dois processos de metabolização, por um lado, sofrem reações de redução, para diminuir o seu potencial biológico, e por outro, sofrem reações de conjugação com o sulfato ou glicuronídeo, para aumentar a sua hidrofília e facilitar a excreção na urina (9). Na tabela I podemos ver a quantidade média excretada pelo ser humano na urina por dia. Esta tabela tem em consideração o sexo e o período de vida em que se encontra o ser humano, pois a excreção deste tipo de hormonas varia muito com estes dois fatores.

	Estrona	Estradiol	Estriol	Etinilestradiol
Homens	3.9	1.6	1.5	-
Mulheres em período fértil	8	3.5	4.8	-
Mulheres em Menopausa	4	2.3	1	-
Mulheres Grávidas	600	259	6000	-
Mulheres que tomam a Pílula	-	-	-	35

Tabela I-Excreção diária de estrogénios em µg por pessoa (7).

A hormona esteroide sintética mais detetada nas águas é o etinilestradiol (EE2), que está presente em muitos contraceptivos orais usado a nível mundial. Esta hormona sintética, quando administrada é depois excretada na sua forma ativa, não sofrendo metabolização no organismo. Este composto é, também, o mais potente entre os encontrados nas águas e o que maiores efeitos têm causado nas populações de peixes (12).

Estas substâncias já foram estudadas farmacologicamente há muito tempo, existindo por isso, muitos medicamentos, com estas substâncias ativas aprovados no mercado. Hoje em dia, os principais usos terapêuticos são a contraceção, a terapia de reposição hormonal, a quimioterapia, como por exemplo cancro da mama, ou no tratamento da endometriose (13). No entanto, os medicamentos mais usados em todo o mundo e cada vez em maior quantidade são os contraceptivos orais, normalmente denominados por pílulas. Estes medicamentos têm diferentes dosagens destas hormonas, sendo que, as de dosagem normal, podem conter de 15-25 µg de EE2, e as de baixa dosagem, podem conter 15-25 µg de EE2 (13).

Atualmente as maiores preocupações da exposição ambiental a hormonas esteroides são os efeitos tóxicos em baixas concentrações, a possibilidade de estas substâncias estarem presentes em concentrações ambientalmente relevantes e a determinação de uma concentração limiar abaixo da qual estas substâncias podem ser consideradas como seguras (7).

3- Consumo

Segundo os dados do Infarmed, em 2011 a associação de etinilestradiol com gestodeno vendeu um total de 704 225 embalagens, sendo a 48ª substância ativa mais vendida nesse ano (14). A EMA realizou um estudo em 2005 onde se verificou que em 2001 foram vendidos 628, 7 Kg de etinilestradiol na UE (15).

Estes dados vêm confirmar que cada vez mais se usa este tipo de medicamentos pois, nos dias de hoje, as mulheres querem ter mais controlo sobre a sua fertilidade e, com a crise económica que atravessam não existe a possibilidade de ter tantos filhos como desejariam.

4- Vias de Contaminação

A maior via de contaminação é, sem dúvida, a excreção através da urina por parte do ser humano, o que vai levar à existência de hormonas esteroides na sua forma ativa ou na forma conjugada nas águas residuais. As águas residuais, mesmo após tratamento nas ETARs,

possuem ainda pequenas quantidades de hormonas esteroides pois, atualmente, não existe nenhum método de tratamento de águas residuais capaz de remover completamente estas substâncias (6). As águas residuais depois de tratadas nas ETARs vão contaminar águas de superfície e subterrâneas (16).

Relativamente ao EE2 esta não é a única via de contaminação. Para além dos comprimidos existem outros métodos de contraceção com esta substância como por exemplo os sistemas transdérmicos, que quando retirados do corpo e deitados fora ainda contêm cerca de 610 µg de EE2, pois só cerca de 80% é usado para efeito terapêutico (15). Depois de usados ou passado o prazo de validade todos os medicamentos deveriam ser entregues na farmácia onde seriam depois recolhidos e corretamente eliminados pela Valormed. A Valormed surge devido à colaboração entre indústria farmacêutica, distribuidores e farmácias em Portugal em face da sua consciencialização para a especificidade do medicamento enquanto resíduo. Tem como principal responsabilidade a gestão dos resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora do prazo de validade, evitando assim consequências ambientais (17). Infelizmente ainda não existe uma sensibilização por parte de toda a população para os medicamentos serem entregues na farmácia, sendo ainda algumas embalagens depositadas no lixo normal, o que vai permitir que estes medicamentos contaminem o solo, as águas de superfície e as águas subterrâneas como podemos ver na figura 3.

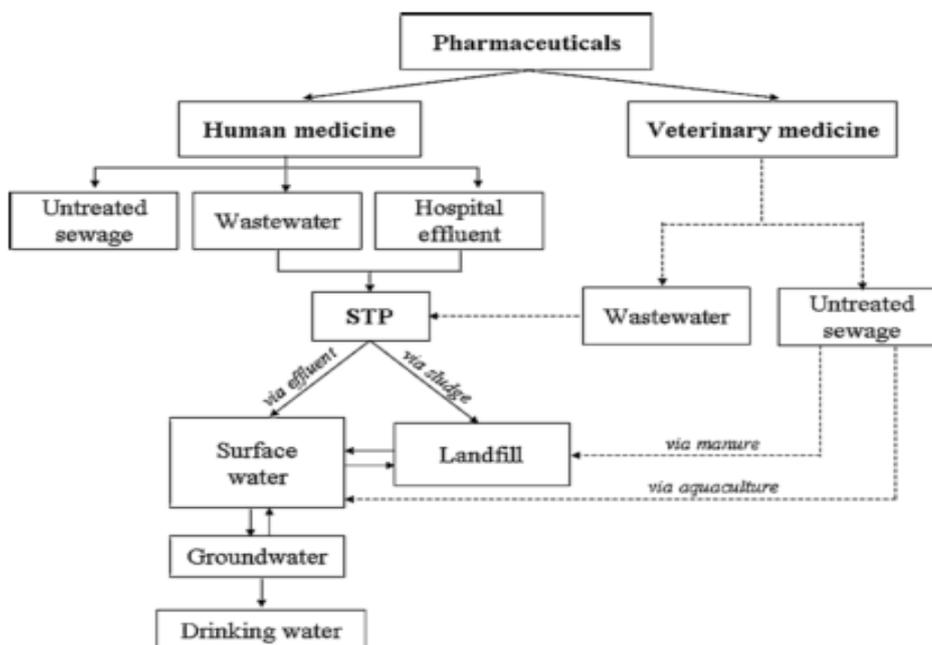


Figura 3- Fontes de contaminação e destinos dos medicamentos (16).

5- Legislação

Uma das formas de minimizar o risco ambiental destas substâncias nos recursos hídricos é através da legislação existente. Esta pode ser feita de duas maneiras distintas, por parte da qualidade da água, cujo principal objetivo da UE é regulamentar os diversos poluentes e melhorar a qualidade química das águas, e por parte da EMA, que tem de ser cumprida por todos os medicamentos quando estes entram no mercado e se estuda o seu risco ambiental com o objetivo de minimizar o risco ambiental dos medicamentos.

5.1- Legislação no domínio da política da água

“A poluição química das águas de superfície constitui uma ameaça para o meio aquático, com efeitos como toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perda de habitats e de biodiversidade, além de constituir uma ameaça para a saúde humana. As causas da poluição deverão ser identificadas e as emissões deverão ser tratadas na fonte, com carácter de prioridade, da maneira mais eficaz, em termos económicos e ambientais” (4). Foi com estas preocupações que a UE criou legislação específica para regular os poluentes nas águas principalmente os poluentes emergentes, através da diretiva 2013/39/UE de 12 de Agosto de 2013.

Esta diretiva tem como objetivo alcançar o bom estado químico das águas de superfície mediante o estabelecimento de Normas de Qualidade Ambiental (NQA) para as diversas substâncias poluentes, e uniformizar o nível de proteção destas mesmas águas em toda a UE (4). As substâncias prioritárias são substâncias que assumem carácter prioritário e com risco significativo para o meio aquático, sendo que estas já possuem NQA bem estabelecidas e onde as concentrações no meio ambiente já estão definidas e a ser cumpridas pelos diversos estados membros. De momento existem 33 substâncias prioritárias, cujas NQA vão ser atualizadas nos próximos 6 anos, mas a diretiva 2013/39/UE tem como um dos objetivos acrescentar mais substâncias a esta lista, para alcançar uma melhor qualidade química das águas (4).

No caso das hormonas esteroides, estas ainda não pertencem ao grupo das substâncias prioritárias, tendo assim de se realizar a avaliação do risco, sendo necessários dados de monitorização de elevada qualidade bem como dados relativos aos efeitos ecotoxicológicos. Apesar de nas hormonas esteroides já existirem dados relativos aos efeitos ecotoxicológicos ainda faltam os dados de monitorização.

A UE estabelece também critérios de desempenho mínimo para os métodos analíticos usados na monitorização do estado da água, para garantir que os dados usados são dados significativos e relevantes. (4) Para diminuir os custos de todo este processo, as substâncias às quais se pretende fazer estudos com o objetivo de as integrar na lista de substâncias prioritárias são colocadas anteriormente numa lista de vigilância. A lista de vigilância deve indicar, para cada substância, as matrizes para monitorização e o método de análise a usar. As substâncias escolhidas para incluir na lista de vigilância devem ser selecionadas de entre aquelas cuja informação disponível indique que podem representar um risco significativo, a nível da UE, para o meio aquático, ou por intermédio deste, e para as quais os dados de monitorização sejam insuficientes (4). A informação, para avaliar a inclusão da substância na lista de vigilância, é recolhida a partir de projetos de investigação, da caracterização feita pelos estados membros das regiões hidrográficas, de dados relativos ao volume de produção, propriedades intrínsecas da substância e de concentrações no ambiente (4).

As duas hormonas, a 17-beta-Estradiol e a 17-alfa-etinilestradiol, já foram incluídas na primeira lista de vigilância, com a finalidade de se obter dados de monitorização para se criar as respetivas NQA. Para a monitorização cada estado membro seleciona pelo menos uma estação de monitorização, mais uma se tiver mais de 1 milhão de habitantes, mais o número de estações correspondentes à sua área geográfica em Km² a dividir por 60 000, mais o número de estações correspondente à sua população a dividir por 5 milhões. A frequência mínima de monitorização é de uma vez por ano. Depois da monitorização feita cada estado membro entrega um relatório à Comissão, sendo o trabalho desta classificar a substância como substância prioritária ou se deve ser excluída da lista de vigilância (4).

5.2- Legislação do Medicamento

Uma Avaliação do Risco Ambiental (ERA) deve acompanhar todos os novos medicamentos quando estes são submetidos a uma Autorização para entrarem no mercado. A ERA consiste em avaliar o risco que os medicamentos possam ter no ambiente. É dividido em duas fases sendo a primeira fase uma estimativa da exposição ambiental do medicamento e a segunda fase onde se tenta demonstrar o risco associado a esta exposição. Na primeira fase a estimativa é feita com base apenas no medicamento, não tendo em consideração a sua vida de administração, a sua forma farmacêutica, o seu metabolismo no utente e a sua excreção. Nesta fase é feita uma previsão da concentração ambiental (PEC), mas apenas para águas de superfície, tendo em conta o sistema de esgotos como a principal fonte de

contaminação. Para este PEC inicial também não se considera a retenção ou biodegradação das substâncias nas ETARs. Se o PEC for menor que 0,01 µg/L e não houver outro perigo ambiental aparente assume-se que o medicamento não apresenta risco para o ambiente da forma como é prescrito. Se o PEC for igual ou superior a 0,01 µg/L, o medicamento segue para os estudos da segunda fase. Para medicamentos que afetem a reprodução de vertebrados ou animais mais simples devem sempre seguir para a segunda fase do ERA, independentemente do seu PEC (5).

Na segunda fase a principal preocupação é o destino e os efeitos do medicamento no ambiente. Esta fase está dividida em duas partes. Na parte A são realizados alguns testes, entre os quais um teste de biodegradação. Se a substância não é biodegradada rapidamente, deve-se realizar um estudo no sedimento da água. Se o medicamento for suscetível a bioacumulação/biossedimentação é realizada uma avaliação de risco específico (5) (18).

Nesta fase calcula-se também a degradação sofrida pelo medicamento através de lamas ativadas, devido a este ser o método mais usado nas ETARs para remoção de poluentes nas águas. Outros estudos realizados na parte A são os estudos de toxicidade de longa duração em peixes, dáfnias e nas algas com o objetivo de prever a concentração sem efeito observável (PNEC) (5). Na parte A são avaliadas também as águas subterrâneas, onde se calcula o PEC de uma forma muito simplificada sendo apenas multiplicado o PEC obtido para as águas superficiais por 0,25 (5).

Comparamos os valores obtidos para as águas superficiais do PEC e do PNEC e se a relação PEC/PNEC for inferior a 1, não é necessário continuar com mais testes pois o medicamento não apresenta risco para o ambiente. Se for superior a 1 temos de prosseguir com os testes passando agora para a parte B do ERA (5).

Depois de identificado o risco potencial na parte A, na parte B o objetivo é demonstra-lo. Na parte B é calculado um novo PEC tendo em consideração todos os parâmetros anteriormente descartados e realizados novos testes no sedimento das águas, para verificar se ocorre alguma alteração ao medicamento enquanto este está depositado.

Um novo estudo de PNEC é realizado mas desta vez em microrganismos, pois apresentam uma sensibilidade maior ao medicamento (5).

No final da parte B já possuímos todas as informações relevantes sobre o medicamento, como quantificação da quantidade excretada pelo utente, possibilidade de toxicidade a longo prazo e a biodegradação sofrida pelo medicamento.

Mesmo quando no final de toda a avaliação não podemos excluir o risco ambiental, esta avaliação não é proibitiva da entrada do medicamento no mercado. Nestas situações a

EMA reforça os cuidados a ter no uso deste tipo de medicamentos, através de avisos de segurança no folheto informativo (5), tentando apelar à responsabilidade ambiental por parte do utilizador.

6- Estudos de ecotoxicidade

As hormonas esteroides possuem efeitos tóxicos para o ambiente, sendo por isso enquadrados na ecotoxicologia. Esta foi definida por Truhaut (1969) e mais tarde por Butler (1978) como “o ramo da toxicologia que estuda a os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais sobre os organismos vivos, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera” (19).

Os principais riscos para o ambiente são anomalias no sistema reprodutor dos animais a nível fisiológico e a nível histológico, principalmente a efeminização, o que poderá levar a diminuição das populações. Também a deteção de vitelogenina (VTG), uma proteína sintetizada pelas fêmeas durante a maturação do oócito, já foi detetada em animais do sexo masculino (7) (20). Outro efeito detetado é a diminuição do sucesso na eclosão de espécies ovíparas, pois vai haver interferência com a produção das proteínas que formam a casca do ovo (16).

Para confirmar os riscos ambientais destes componentes na vida selvagem animal foi realizado um estudo em laboratório que prova a influência direta destes compostos no desenvolvimento, de uma espécie de peixe o *Mangrove Rivulus* (21). Esta espécie tem a particularidade de ser um peixe hermafrodita, que se reproduz por autofecundação, e que na natureza também se podem encontrar alguns machos mas nunca se provou a existência de fêmeas. Este estudo tinha dois objetivos principais sendo eles tentar desenvolver fêmeas em laboratório e criar um protocolo e o segundo era avaliar o efeito do EE2 no desenvolvimento sexual, na saúde reprodutiva e na expressão de genes desta espécie (21).

Para atingir estes objetivos foram recolhidos embriões de *Mangrove Rivulus* e foram sujeitos a diferentes concentrações de EE2 ao longo do seu desenvolvimento (21).

Todos os embriões em estudo foram recolhidos de uma única estirpe. Foram então divididos em grupos de 20 e deixados a eclodir em aproximadamente 15 dias. Depois de eclodir estes foram divididos em grupos de 15 onde eram expostos a diferentes concentrações de EE2 sendo no primeiro grupo de 0.1 ppm, no segundo 0.5 ppm e no terceiro 1.0ppm. Foram deixados nestas condições durante 28 dias, ao qual no final destes, eram retirados para outro aquário, onde foram deixados até atingirem a maturidade sexual.

Depois de atingirem a maturidade sexual, aproximadamente em 3 meses, foram mortos por deslocamento cervical, sendo analisado o cérbero, as gonadas e o fígado utilizando a técnica de PCR em tempo real (21).

Dos resultados obtidos vou-me focar apenas naqueles que se referem ao segundo objetivo deste estudo. Nas gonadas não foi detetada nenhuma diferença significativa na expressão de genes recetores das hormonas esteroides, sendo só no recetor *cyp19a1a* que se notou um decréscimo, que foi mais acentuado nos peixes sujeitos a uma concentração de 1.0 ppm de EE2 (21).

Os resultados mais esclarecedores dos efeitos causados por estes compostos foram então verificados ao nível da esterilidade e da fertilidade dos peixes. A taxa de esterilidade foi definida com o número de peixes que não foram capazes de produzir um embrião viável, ou um embrião não viável ou um ovulo não fertilizado durante os 3 meses que tiveram em estudo (19). No grupo controlo a taxa de esterilidade foi de 0% uma vez que todos os peixes conseguiram produzir embriões viáveis. No grupo sujeito á concentração de 0.1 ppm a taxa de esterilidade foi de 7%. A taxa de esterilidade aumentou com o aumento da concentração de 17- α etinilestradiol, atingindo um valor de cerca 40% para os outros dois grupos. Estes dados podem ser verificados na figura 4 no gráfico A (19).

A taxa de infertilidade foi definida como o número de embriões fertilizados viáveis e não viáveis a dividir pelo número total de ovos/ embriões produzidos. Neste ponto os peixes que foram considerados estéreis foram retirados da análise (21).

No grupo controlo dos 100% de peixes que produziram embriões, a taxa de fertilidade foi de 71%. No grupo com a concentração de 0.1 ppm a taxa de fertilidade desceu para os 61%, sendo que para os grupos de 0.5 ppm e 1.0 ppm as taxas foram de 32% e 12% respetivamente. Estes dados pode ser verificados na figura 4 no gráfico B (21).

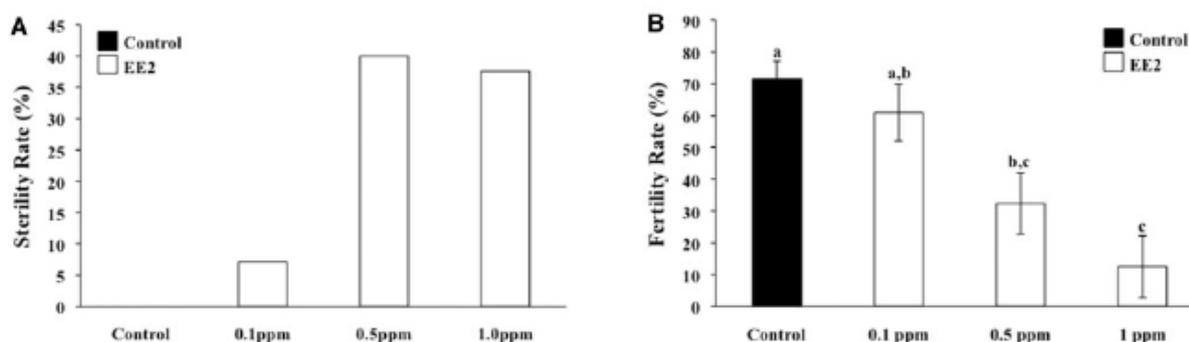


Figura 4- (A) Taxa de esterilidade nos diferentes Grupos; (B) Taxa de fertilidade nos diferentes grupos (21).

Foi também demonstrado que o EE2 atrasa a maturação sexual dos peixes uma vez que os peixes expostos a concentrações de EE2 só conseguiram produzir óvulos/embriões dias depois do grupo controlo (21).

Avaliando estes resultados chegamos a conclusão que os desreguladores endócrinos vem afetar de uma forma bastante marcada as populações selvagens. Neste caso em particular podemos concluir que a diminuição dos recetores de *cyp19a1a* afeta negativamente a espermatogénese. Concluimos também que a parte mais afetada é a saúde reprodutiva, onde se observa uma relação dose efeito, onde com doses maiores de 17- α etinilestradiol os resultados vão sendo mais negativos (21).

Outro estudo foi realizado num lago no Canadá (Lago 1), durante 7 anos, que pretendia demonstrar os efeitos de uma exposição crónica na população de peixes (*Pimephales promelas*) a concentrações muito baixas de EE2, entre os 5-6 ng/L (12). O EE2 foi adicionado no Lago 1 em 3 anos consecutivos (2001,2002,2003). Este estudo foi bastante importante pois apesar de estarem demonstrados os riscos em laboratório, ainda se desconhecia a potência dos efeitos no terreno (12).

Foi utilizado outro lago (Lago 2) neste estudo, onde não foi adicionado EE2, para servir como controlo. No final das primeiras 7 semanas de estudo, já se podia observar que nos peixes machos do Lago 1 as concentrações de VTG já eram cerca de 3 vezes mais elevadas do que as produzidas pelos peixes machos do Lago 2. Também as fêmeas do Lago 1 produziam mais proteína VTG quando comparadas com as do Lago 2. Estes valores mantiveram-se assim ao longo do ensaio, verificando-se que no final dos primeiros 3 anos os peixes machos do Lago 1 produziam maiores quantidades de VTG que os peixes fêmeas do Lago 2 (12).

Outro ponto estudado neste ensaio foi o efeito destas substâncias nos órgãos sexuais destes peixes. Este era também um ponto de interesse pois estudos em laboratórios demonstravam que havia interferências no desenvolvimento das gónadas quando expostos a estas substâncias. Este efeito foi observado logo na primavera do primeiro ano, depois da adição do EE2, em 2001. Os machos recolhidos nessa altura apresentavam já sinais de espermatogénese diminuída, fibrose generalizada, e malformações dos túbulos. No terceiro ano de experiência, em 2003, já 4 em cada 9 macho capturados tinham um órgão sexual que misturava ovários e testículos com presença de oócitos na primeira fase de maturação como podemos observar na figura 5 (12).

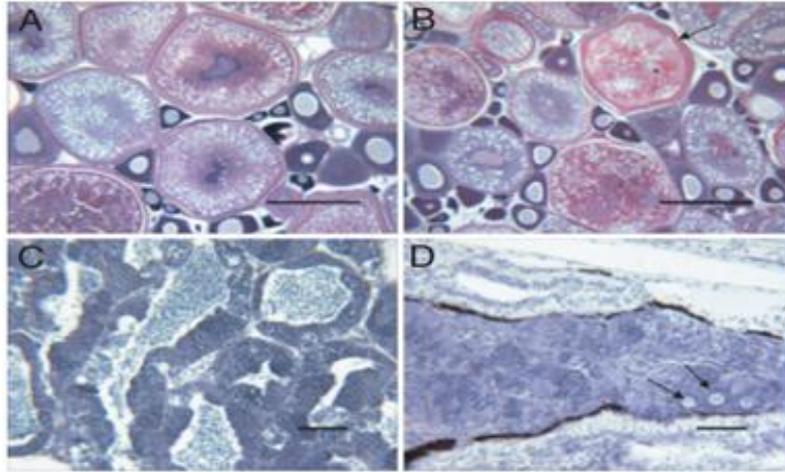


Figura 5- Cortes histológicas das gónadas em Maio 2003 (A) Ovário de peixe do lago 2 com oócitos de primeiro estágio. (B) Ovário de um peixe do lago 1 (C) Testículos de um peixe do lago 2 (D) Testículos de um peixe do lago 1 (as setas indicam oócitos de primeiro estágio) (12).

Estes acontecimentos levaram a uma diminuição da população no lago, pois estes peixes machos tinham menor probabilidade de sucesso na fertilização, devido á perda de produção e da mobilidade do seu esperma (12).

A primeira quebra abrupta na população foi verificada na primavera do segundo ano de estudo (2002) devido à perda da população jovem, pois no ano anterior foi o primeiro ano em que houve um decréscimo na reprodução. Após os 3 anos em que se adicionou EE2 a população de *Pimephales promelas* foi ficando cada vez menor ate ao ano de 2005 onde era quase inexistente (12).

No caso da vida selvagem animal, em particular nos peixes, os efeitos são de fácil observação pois como eles vivem nas águas a sua exposição é muito maior que à dos seres humanos, onde a sua exposição é apenas pela água que ingerem. Devido a esta particularidade vou agora salientar um estudo realizado por Cadwell et al., onde se tenta demonstrar que as concentrações de hormonas esteroides são mínimas nas águas que consumimos ou chegam até a nem existir (22). Neste estudo foi calculada uma estimativa da concentração presente na água de consumo nos EUA com um programa de estatística, pois ainda não existem estudos que indiquem concentrações detetáveis (22). Foram então calculadas as concentrações de estrogénios naturais (E2, estrona) e de estrogénios prescritos como é o caso do EE2. Estas concentrações foram calculadas a partir de dados onde se tinha em consideração a quantidade consumida, a quantidade excretada e uma estimativa da quantidade retida pelos tratamentos nas ETAR e no tratamento para a água de consumo. De referir que estas concentrações foram calculadas sempre em termos de o pior

cenário. No final fez-se uma comparação com as hormonas esteroides, que nós ingerimos através da alimentação (em alguns casos converteram o EE2 em equivalentes de E2, devido a este ser natural e estar sempre presente) (22).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) definiu em 2000 uma Dose Diária Admissível (DDA) sendo de 0.05 µg de EE2/kg de peso corporal/ dia. Se consideremos uma pessoa de 60 kg a DDA é de 3 µg/dia. Esta dose é ainda mais baixa para as populações sensíveis como é o caso das crianças ou das grávidas (22).

Segundo este estudo concluímos que, a dose de hormonas que ingerimos pela água é muito menor que a ingerida através da alimentação. Por exemplo a dose que é ingerida através da água nos EUA é cerca de 82 vezes menor que a dose ingerida através da alimentação (22) (15). Assim segundo este estudo a quantidade presente na água não é suficiente para causar qualquer tipo de efeito na população humana, nem mesmo nas subpopulações mais sensíveis (22).

No entanto estas substâncias podem causar alterações no sistema endócrino, incluindo alterações no sistema reprodutivo feminino (diferenciação sexual, função dos ovários, aumento no risco de cancro de mama e de vagina, ovários policísticos e endometriose) e no sistema reprodutivo masculino (redução na produção de esperma, aumento do risco de cancro testicular e da próstata, infertilidade e alterações nos níveis hormonais da tiroide) (3). Apesar de estes efeitos estarem assumidos como prováveis, ainda não foram provados cientificamente pois, não está provado que as concentrações de ingestão diárias por parte do ser humano sejam suficientes para os causar (22).

7- Metodologias analíticas para determinação das Hormonas

Devido à heterogeneidade das amostras ambientais, a análise destes compostos a nível residual é de extrema complexidade. A sua determinação no ambiente é de fundamental importância, pois como foi referido anteriormente, os seus efeitos tóxicos fazem-se notar a concentrações muito baixas. É também fundamental uma correta identificação e quantificação destes compostos nos diferentes compartimentos ambientais de modo a que se possa estabelecer a sua regulamentação com o objetivo fundamental de minimizar o risco ambiental.

O método mais usado é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada à Espectrometria de Massa (EM).

Em primeiro lugar temos de proceder à amostragem e ao tratamento da amostra, duas etapas fundamentais para a obtenção de resultados de confiança.

A amostragem deve ser representativa de toda a área que queremos analisar, sendo que no caso da água como amostra biológica devemos fazer a recolha a jusante da fonte de poluição. Devemos assegurar a conservação da amostra até esta ser analisada. Um estudo realizado por Briciu, et al., procedeu a recolha da amostra em garrafas âmbar e para manter a integridade das amostras, procedeu a um tratamento prévio com uma solução de formaldeído a 1%, para inibir o crescimento bacteriano. Desta forma, quando armazenadas a 4°C, demonstrou que durante 24 dias não se verifica decomposição das hormonas esteroides na amostra (8).

O passo seguinte é a preparação da amostra para a análise. O primeiro passo na preparação da amostra é a filtração, onde normalmente é usado um filtro de fibra de vidro com o tamanho do poro entre os 0.22 e os 120 µm (8).

Depois de filtrada a extração de hormonas esteroides de amostras de águas superficiais e de águas residuais, é normalmente feita através de extração em fase sólida (SPE), apesar de dentro desta técnica estarem disponíveis vários adsorventes. A SPE tem como objetivo extrair, concentrar e purificar os compostos em estudo da amostra, para posterior análise por HPLC. A SPE é realizada numa coluna com uma fase sólida, o adsorvente, que à passagem da amostra vai reter o analito que pretendemos analisar devido a interações entre este e o adsorvente. Depois de passada a amostra vamos proceder a lavagem para retirar todos os interferentes presentes na amostra. Por último procedemos à eluição com um solvente que quebre as ligações entre o analito e o adsorvente, permitindo a eluição completa do analito. Existem vários fatores que podem afetar a extração das hormonas como o pH, a força iónica, o volume da amostra e a fase sólida escolhida, e que tem de ser tido em consideração nos estudos de otimização e validação da metodologia analítica (23). As fases sólidas mais utilizadas são o Oasis HLB e o Carbograph-4. O carbograph-4 é escolhido devido ao seu grande poder adsortivo, baseado nas trocas de aniões e nas suas propriedades hidrofóbicas, enquanto o Oasis HLB é escolhido porque é muito sensível, chegando a extrair mais de 91% dos constituintes de amostras de águas (8).

O estudo realizado por Briciu et al., compara a SPE em dois modos, *online* e *offline*, sendo que o método *offline* é o mais utilizado. A SPE *online* é um método mais rápido pois permite economizar tempo na preparação da amostra, visto que os passos de lavagem e eluição são feitos automaticamente e vai permitir também que enquanto uma amostra é preparada outra amostra já esteja a ser analisada por HPLC. O rendimento da amostra

injetada por este processo também é maior. Este método torna-se então atrativo em situações em que se tem um elevado número de amostras ou amostras em série (8).

O método *offline* é favorável quando temos de analisar uma amostra, obtida de um só local mais que uma vez. O método *online* acoplado a HPLC é superior em termos de exatidão, eficácia e capacidade de multi-análise em relação ao método *offline* (8).

Depois de concentrada a amostra e se fazer a extração dos seus componentes temos então de os separar e quantificar, sendo para isso usado o método de HPLC. O HPLC consiste num método que tem uma fase móvel e uma fase estacionária. Os diferentes constituintes da amostra vão então interagir de diversas formas com a fase estacionária apresentando tempos de retenção diferentes, permitindo assim a sua identificação e quantificação (24).

Normalmente é escolhida a HPLC em detrimento da Cromatografia Gasosa (CG), pois nesta é necessário uma derivatização ou a hidrólise da forma conjugada (8).

Como as amostras biológicas são de extrema complexidade, e os analitos em estudo encontram-se presentes em quantidade residuais, para a sua identificação e quantificação específica é imprescindível a deteção por EM.

A EM permite a identificação dos compostos, bombardeando a amostra com um feixe de iões (ionização) que vai fragmentar as moléculas em fragmentos carregados energeticamente ou em iões. Em seguida estes fragmentos são identificados segundo a sua relação de massa/carga. As moléculas da amostra podem ser assim classificadas através da comparação dos fragmentos que surgem no espectro com os descritos na bibliografia ou com uma solução padrão (24).

Utilizando esta metodologia analítica foram detetadas concentrações residuais de hormonas esteroides em diversos tipos de águas, a nível internacional. Em seguida vou apresentar alguns dos dados obtidos nesses estudos relativos á concentração de E2 em águas de superfície na França, entre 0,8-3,5 ng/L (16); em águas fluentes de hospitais em Taiwan, 25 ng/L (16); em rios no Japão, 0.6-1.0 ng/L (16); e na Alemanha em águas efluentes de ETARs, 11.8 ng/L (16); na Coreia do Sul em águas efluentes de ETARs, menor que 0.1 ng/L (16), e em águas de superfície, não foram detetadas (16); na china em águas de um rio, 100 ng/L (16); em Itália no rio Tibre, 2-6 ng/L, em águas residuais. 3-8 ng/L (16).

Na literatura científica encontram-se também descritos estudos que demonstram a presença de EE2 em águas de superfície nos EUA, 73 ng/L (16); em águas efluentes de ETARs no Luxemburgo, 2.0-24 ng/L (16); e em águas subterrâneas na França, 0,5-3 ng/L (16);em

Taiwan em águas hospitalares, 32 ng/L (16); na Coreia do Sul em águas efluentes de ETARs, 1.3 ng/L (16); na Alemanha em águas superficiais, 0.2 ng/L (16).

8- Como tratar as águas contaminadas?

De acordo com o descrito anteriormente, verifica-se uma contaminação generalizada dos diversos tipos de águas, a nível mundial, com hormonas esteroides, mesmo após tratamento nas ETARs.

Este problema surge pois as hormonas esteroides são compostos de elevada estabilidade e de difícil decomposição no ambiente, mesmo após várias semanas. Atualmente, e como demonstrados por vários estudos científicos, os diferentes tratamentos disponíveis nas ETARs não promovem a completa remoção das hormonas esteroides (6). Novas tecnologias de tratamento têm sido alvo de estudo. Estudos realizados demonstram que os processos oxidativos, tais como, a ozonização são tecnologias promissoras na remoção destes poluentes emergentes. Outros tratamentos também foram investigados na remoção de hormonas esteroides, como a filtração em carvão ativado, processos com membranas de nano filtração, osmose reversa e cloração (7).

Um estudo realizado por Ogata et al. demonstrou a eficácia de dois métodos na remoção de estrogénios nas águas, o método de carvão ativado e o método de ozonização (6). Estes dois métodos têm diferentes mecanismos de atuação sobre os micropoluentes, querendo os autores avaliar qual seria mais eficaz. O carvão ativado vai absorver os poluentes, retirando-os da água. Este tratamento é bastante usado nos dias de hoje juntamente com o método das lamas ativadas (6). Por sua vez a ozonização vai oxidar estes compostos, quebrando as ligações insaturadas dando origem a compostos de peso molecular mais leve e menos perigosos para o ambiente. Este método tem como principal desvantagem a interação com o oxigénio presente na água e com o pH (6). Apesar destas desvantagens, a ozonização e a fotocatalise são os métodos mais promissores, no que diz respeito a remoção das hormonas esteroides.

No caso do carvão ativado, os resultados obtidos foram satisfatórios apesar de algumas desvantagens que serão discutidas mais à frente. Neste estudo comprovou-se também que quanto maior for a quantidade de carvão ativado maior vai ser a remoção das hormonas esteroides (6). Ficou também provado que este método é mais eficiente para certos compostos uma vez que depende da capacidade de absorção do carvão ativado para determinado composto. Ficou demonstrado que a estrona é a hormona mais facilmente

absorvida, cerca de duas vezes mais absorvida que o estriol, pois este tem na sua estrutura mais grupos hidroxilos e a interação entre estes grupos e o carvão ativado era fracamente hidrofóbica (6).

Outra desvantagem deste método é que numa amostra que contenha diversos poluente a absorção irá ser menos eficaz do que em amostras só com um poluente, ficando assim provado que os poluentes competem pelo mesmo local de absorção (figura 5) (6). Este aspeto é uma enorme desvantagem pois as amostras biológicas são de extrema complexidade o que faria com que fosse preciso uma grande quantidade de carvão ativado para uma total remoção de todos os poluentes (6).

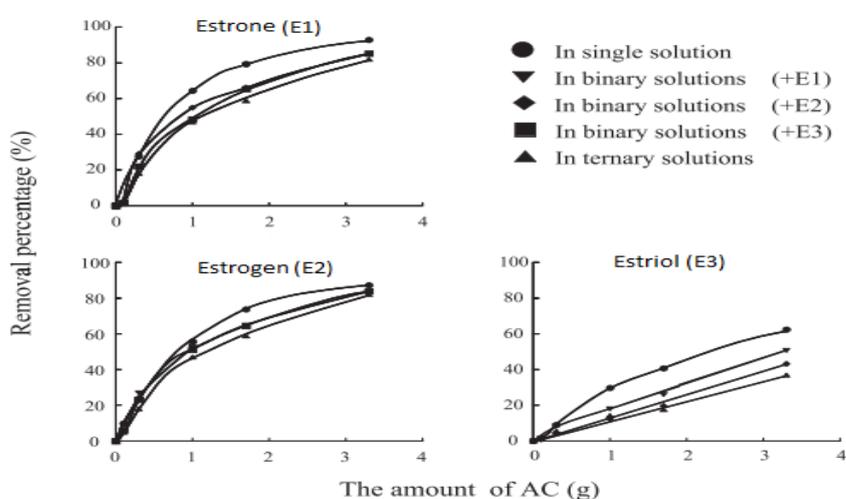


Figura 6- Efeito da Dose de carvão ativo na remoção de estrogénios (6).

Quanto ao método de ozonização revelou-se mais eficaz, tendo-se verificado uma total decomposição dos componentes estrogénicos ao fim de 30 min (6). Também neste método a remoção dos poluentes era mais rápida quando eles se encontravam sozinhos na amostra, o que demonstra que neste método existe também uma competição entre as diversas hormonas esteroides (6). Neste método ao contrário do verificado no método de carvão ativado, o estriol foi o composto que foi eliminado em menos tempo (6). Apesar de uma total remoção dos poluentes, verificou-se as duas desvantagens principais deste método, já descritas em cima, sendo que o pH da água baixou para valores á volta dos 3,5-4,0 nos primeiros 30 min, mantendo-se constante neste valor ao longo do estudo. Também se verificou uma diminuição do oxigénio na água, diminuição que era linear com a duração do tratamento (6).

9- Conclusão

Com esta monografia podemos concluir que a contaminação das águas com medicamentos, nomeadamente hormonas esteroides, é uma realidade e começa a haver cada vez mais uma consciencialização para este problema, por partes de várias instituições e órgãos reguladores.

Apesar das hormonas esteroides terem inúmeras vantagens para o ser humano a nível terapêutico, possuem um risco ambiental.

Ao analisarmos os vários estudos apresentados, podemos concluir que os efeitos tóxicos são já bastante marcados em algumas populações de espécies animais no ambiente aquático. Salientando a disfunção dos órgãos sexuais, e a inferior capacidade de reprodução destas espécies. Ficou provado que a disfunção sexual, através de sistemas reprodutores que possuem ovários e testículos, até a deficiência na espermatogénese, afetam a reprodução dos peixes e a sua população vai diminuindo. Com o estudo realizado no lago do Canadá, comprovamos que uma exposição prolongada, multigeracional, pode conduzir à extinção da espécie (12). Pelo que precisamos de ter uma maior consciencialização para estes efeitos ou, caso contrário, podem levar a extinção de algumas populações de peixes, bases da cadeia alimentar.

Assim sendo, para o ser humano, a principal fonte de exposição é a água de consumo. No entanto, apesar de ainda não estar demonstrado pela literatura científica, concentrações suficientemente altas que possam causar efeitos nos seres humanos (22), prevê-se que os possam vir a sofrer, principalmente na diminuição da qualidade do esperma, hipospadia, a probabilidade aumentada de cancro testicular, da próstata e da mama, endometriose e ainda efeitos ao nível da tiroide e do sistema nervoso central (25).

Sendo a sua presença no meio aquífero inevitável temos de procurar criar medidas de minimizar a contaminação das águas com estas substâncias.

No âmbito das medidas de minimização do risco ambiental do medicamento, é de salientar a recente legislação específica com vista a diminuir os efeitos do medicamento nas águas, no domínio da política da água e por parte da EMA realçando a importância e pertinência desta problemática. A Comissão estabelece uma lista de vigilância onde foram incluídos pela 1ª vez 3 medicamentos, entre os quais o 17-beta-estradiol (E2) e o 17-alfa-etinilestradiol (EE2) a fim de recolher dados de monitorização para facilitar determinação das medidas adequadas para fazer face ao risco que essas substâncias constituem.

De salientar a posição de várias indústrias farmacêuticas, no estabelecimento de medidas de minimização do risco dos medicamentos no ambiente, criando normas e protocolos internos (26).

Finalmente, realçar também a atuação da Valormed garantindo a recolha de todos os medicamentos fora de prazo de validade e a sua eliminação de forma segura, contribuindo para a minimização do risco para o ambiente.

10- Bibliografia

1. FARRÉ M, PÉREZ S, KANTIANI L, BARCELÓ D. -**Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment.** *Trends Anal Chem.* 2008;27:991-1007.
2. FILBY AL, NEUPARTH T, THORPE KL, OWEN R, GALLOWAY TS, TYLER CR.- **Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects.** *Environ Health Perspect.* 2007;115(12):1704-10. doi:10.1289/ehp.10443.
3. RODRIGUEZ-MOZAZ S, ALDA ML, BARCELÓ D. -**Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry.** *J Chromatogr A.* 2004;1045(1-2):85-92. doi:10.1016/j.chroma.2004.06.040.
4. PARLAMENTO EURPEU. -**Diretiva 2013/39/UE.** *Jornal da União Eur.* 2013:1-17.
5. EMA. -**Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use.** 2006;(Junho):1-12.
6. OGATA F, TOMINAGA H, YABUTANI H, KAWASAKI N. -**Removal of estrogens from water using activated carbon and ozone.** *J Oleo Sci.* 2011;611(12):609-611. Disponível em: <http://jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jos/60.609?from=Google>. Acedido em 23 de Junho, 2014.
7. MAIA D, DEZOTTI M. -**Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências.** *Quim Nova.* 2007;30(3):651-666.
8. BRICIU RD, WASIK AK, NAMIESNIK J.- **Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments.** *J Chromatographic Sci.* 2009;47(2):127-39. Disponível em: <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/47/2/127.short>. Acedido em 23 de Junho, 2014.
9. SEELEY R, STEPHENS T, TATE P.- **Anatomia & Fisiologia.** 6ª Edição. (Lusodidacta, ed.); 205AD.
10. GORELICK DA, IWANOWICZ LR, HUNG AL, BLAZER VS, HALPERN ME.- **Transgenic zebrafish reveal tissue-specific differences in estrogen signaling in response to environmental water samples.** *Environmental Health* 2014;122(4):356-62. doi:10.1289/ehp.1307329.
11. PURVES WK, SADAVA D, ORIANI GH, HELLER HC.- **Vida :A Ciência Da Biologia.** 8ª Edição. (Artmed, ed.); 2009:462.
12. KIDD KA, BLANCHFIELD PJ, MILLS KH, et al.- **Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen.** *Proc* 2007;104(21):8897-901. doi:10.1073/pnas.0609568104.
13. GUIMARÃES S, DANIEL M, SILVA P. -**Terapêutica Medicamentosa E as Suas Bases Farmacológicas.** 5ª Edição. Porto Editora; 2006.
14. INFARMED. -**Estatística do Medicamento 2011.** 2011. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA_MEDICAMENTO/EstMed-2011.pdf. Acedido a 25 Junho, 2014.

15. BIO INTELLIGENCE SERVICE. -**Study on the environmental risks of medicinal products**. 2013;(December):261-268. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/environment/study_environment.pdf. Acedido a 25 Junho, 2014.
16. SANTOS LHMLM, ARAÚJO a N, FACHINI A, PENA A, DELERUE-MATOS C, MONTENEGRO MCBSM. -**Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment**. *J Hazard Mater*. 2010;175(1-3):45-95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.
17. VALORMED. Disponível em: <http://www.valormed.pt/pt/conteudos/conteudo/id/5>. Acedido a 1 Julho, 2014.
18. EMA. -**Questions and answers on ' Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use '**. 2011;44(Março 2014).
19. KLAASEN CD. -**Toxicology: The Basic Science of Poisons**. Seventh Ed. Mc Graw Hill Medical; 2007:1157-1180.
20. COLBORN T, SAAL F vom, SOTO A. -**Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans**. *Environmental Health* 1993;101(5):378-84. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519860/>. Acedido a 23 Junho, 2014.
21. FARMER JL, ORLANDO EF.- **Creating females? Developmental effects of 17 α -ethynylestradiol on the mangrove rivulus' ovotestis**. *Integr Comp Biol*. 2012;52(6):769-80. doi:10.1093/icb/ics110.
22. CALDWELL DJ, MASTROCCO F, NOWAK E, et al.- **An assessment of potential exposure and risk from estrogens in drinking water**. *Environ Health Perspect*. 2010;118(3):338-44. doi:10.1289/ehp.0900654.
23. ALONSO RG, FERRERA ZS, RODRIGUEZ JJS.- **Simultaneous determination of hormonal residues in treated waters using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *J Analytical Methods in Chemistry* 2013;2013:210653. doi:10.1155/2013/210653.
24. SKOOG DA, HOLLER EJ, CROUCH SR. -**Principals of Instrumental Analysis**. 6^a Edition.; 2007.
25. FALCONER IR. -**Are endocrine disrupting compounds a health risk in drinking water?** *Int J Environ Res Public Health*. 2006;3(2):180-4. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3807508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
26. ROCHE.- **Roche Position on Pharmaceuticals in the Environment**. 2011:1-5. Disponível em: http://www.roche.com/pharmaceuticals_in_the_environment.pdf. Acedido a 3 Julho, 2014.